



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105636985 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 01

(21) 申请号 201480052069. 7

(22) 申请日 2014. 08. 22

(30) 优先权数据

2013903189 2013. 08. 22 AU

PCT/AU2013/001132 2013. 10. 03 AU

2014900741 2014. 03. 05 AU

2014901002 2014. 03. 21 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 03. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2014/000830 2014. 08. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/024060 EN 2015. 02. 26

(71) 申请人 昆士兰医学研究所理事会

地址 澳大利亚昆士兰州

(72) 发明人 M·斯迈思

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 韩文华

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 37/04(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 31/12(2006. 01)

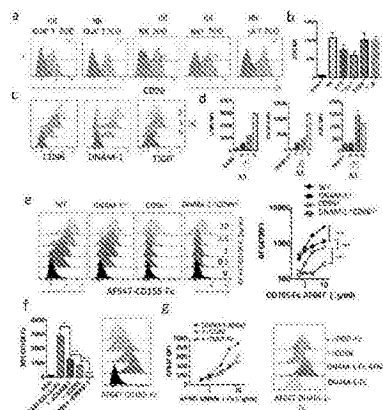
权利要求书2页 说明书22页 附图19页

(54) 发明名称

用于治疗癌症和病毒感染的免疫受体调节

(57) 摘要

一种在哺乳动物中减少或缓解免疫抑制的方法,包括在一种或更多种哺乳动物的细胞中至少部分抑制或减少 CD96 活性的步骤,从而在哺乳动物中缓解免疫抑制和 / 或提高或恢复免疫监视。典型地,抑制或减少 CD96 活性不包括或不依赖杀伤哺乳动物中表达 CD96 的细胞。所述方法在哺乳动物中缓解免疫抑制和 / 或提高或恢复免疫监视,从而在哺乳动物中治疗或预防癌症或癌症转移和 / 或病毒感染。还提供了一种筛选、设计、工程化或者生产 CD96 抑制试剂的方法,所述 CD96 抑制试剂在哺乳动物中缓解免疫抑制和 / 或提高或恢复免疫监视。典型地, CD96 抑制试剂是抗体或抗体片段。



1. 一种在哺乳动物中减少或缓解免疫抑制的方法,所述方法包括在一种或更多种哺乳动物的细胞中至少部分抑制或减少CD96活性的步骤,从而在哺乳动物中缓解免疫抑制和/或提高或恢复免疫监视。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中在哺乳动物中至少部分抑制或减少CD96活性的步骤不包括或至少不依赖杀伤哺乳动物中表达CD96的细胞。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在哺乳动物中至少部分抑制或减少CD96活性的步骤包括对哺乳动物施用CD96抑制试剂。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述CD96抑制试剂与一种或更多种CD96的外部免疫球蛋白样结构域结合或相互作用。

5. 根据权利要求3所述的方法,其中所述CD96抑制试剂与选自以下的一种或更多种CD96的外部免疫球蛋白样结构域结合或相互作用:结构域1;结构域2;结构域3;结构域1和结构域2;结构域1和结构域3;结构域2和结构域3;以及结构域1、结构域2和结构域3。

6. 根据权利要求4或5所述的方法,其中所述CD96抑制试剂与一种或更多种人类CD96同种型2(SEQ ID No:2)的外部免疫球蛋白样结构域结合或相互作用。

7. 根据任一项或权利要求3-6中所述的方法,其中所述CD96抑制试剂至少部分封闭或抑制CD96结合CD155和/或通过CD96的细胞内信号传导。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述CD96抑制试剂是抗CD96抗体或抗体片段。

9. 根据前述任一项权利要求中所述的方法,其包括施用一种或更多种其他的治疗试剂。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述一种或更多种其他的治疗试剂包括化疗试剂和一种或更多种结合PD1和/或CTLA4的抗体或抗体片段。

11. 根据前述任一项权利要求中所述的方法,其增加或提高在哺乳动物中一种或更多种细胞的细胞因子和/或趋化因子表达和/或分泌。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述细胞因子和/或趋化因子包括MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、TNF- α 和IFN- γ 。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述细胞因子是干扰素 γ (IFN- γ)。

14. 根据权利要求11、权利要求12或权利要求13所述的方法,其中所述一种或更多种细胞是T细胞,包括CD4⁺和CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞和NK T细胞、以及自然杀伤(NK)细胞。

15. 根据前述任一项权利要求中所述的方法,其在哺乳动物中治疗或预防癌症或癌症转移。

16. 根据前述任一项权利要求中所述的方法,其在哺乳动物中治疗或预防病毒感染。

17. 根据前述任一项权利要求中所述的方法,其中所述哺乳动物是人类。

18. 一种筛选、设计、工程化或者生产CD96抑制试剂的方法,所述方法包括测定候选分子是否能够至少部分抑制或减少CD96活性、从而在哺乳动物中缓解免疫抑制和/或提高或恢复免疫监视的步骤。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述CD96抑制试剂与一种或更多种CD96的外部免疫球蛋白样结构域结合或相互作用。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述CD96抑制试剂与选自以下的一种或更多种CD96的外部免疫球蛋白样结构域结合或相互作用:结构域1;结构域2;结构域3;结构域1和

结构域2;结构域1和结构域3;结构域2和结构域3;以及结构域1、结构域2和结构域3。

21.根据权利要求19或权利要求20所述的方法,其中所述CD96抑制试剂与一种或更多种人类CD96同种型2(SEQ ID No:2)的外部免疫球蛋白样结构域结合或相互作用。

22.根据权利要求18-21中任一项所述的方法,其中所述CD96抑制试剂是抗体或抗体片段。

23.根据权利要求18-22中任一项所述的方法,其中所述CD96抑制试剂是抗癌症试剂。

24.根据权利要求15-23中任一项所述的方法,其中所述CD96抑制试剂是抗病毒试剂。

25.根据权利要求18-24中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物是人类。

26.一种CD96抑制试剂,其根据权利要求18-25中任一项所述的方法筛选、设计、工程化或者生产。

27.根据权利要求26所述的CD96抑制试剂,用于根据权利要求1-17中任一项所述的方法。

用于治疗癌症和病毒感染的免疫受体调节

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫受体CD96。更具体地,本发明涉及CD96的抑制,从而提高免疫系统靶向肿瘤和其他能逃逸免疫系统的疾病或病症的能力。

背景技术

[0002] 有效免疫应答的进展需要通过若干免疫的检查点(checkpoint)。通路可能需要兴奋性共刺激信号传导的存在或者负面的或共抑制信号传导的逃避,负面的或共抑制信号传导作用于降低或终止免疫活性。免疫球蛋白超家族在这种免疫应答的协调中占据着核心重要地位,并且CD28/细胞毒T淋巴细胞抗原-4(CTLA-4):B7.1/B7.2受体/配体组代表了这些免疫调节因子的原型实例。这些检查点的部分作用是监视不需要的和有害的自主(self-directed)活性的可能性。虽然这是一种必要的功能,有助于自体免疫的预防,但是它可能充当旨在靶向恶性的自体细胞的成功免疫治疗的障碍,其中恶性的自体细胞主要显示与它们所衍生来自的细胞相同的表面分子阵列。旨在克服这些外周耐受机制的治疗,特别是通过封闭在T细胞上抑制性检查点,提供了产生抗肿瘤活性的潜力,或者作为单一治疗或与其他治疗协同作用,直接或间接的提高肿瘤表位提呈至免疫系统。此种抗T细胞检查点的抗体在晚期人类癌症的早期临床试验中显示出前景。

[0003] 此外,自然杀伤(NK)细胞是限制早期肿瘤生长和转移的关键的先天(innate)淋巴细胞¹。NK细胞功能同样是通过广泛的激活和抑制受体的信号传递的整合来调节²。例如,病原体来源的或压力诱导的配体被激活受体如NCR、NKG2D、或DNAM-1识别,刺激NK细胞细胞毒性和促炎介质的分泌,如干扰素 γ (IFN- γ)³。相反地,抑制性受体保护靶细胞免受NK细胞介导的杀伤⁴。这些受体主要地识别MHC I类和MHC I类相关分子,以及包括KIR(杀伤细胞免疫球蛋白样受体)和LIR(白细胞免疫球蛋白样受体)家族,小鼠中Ly49家族和在两物种中的CD94/NKG2异二聚体。

[0004] 最近已描述了免疫球蛋白超家族成员的新出现的组与粘连蛋白和粘连蛋白样(nec1)家族的配体相互作用,影响NK细胞和T细胞功能⁵。这些包括CD226(DNAM-1)⁶、CD96(TACTILE)⁷、TIGIT(T细胞免疫球蛋白和ITIM结构域)^{8,9}、和CRTAM(I类限制性T细胞相关分子)¹⁰。DNAM-1和TIGIT是该家族最广泛研究的成员,并且它们共享共同的配体,CD 155(nec1-5;PVR)和CD112(粘连蛋白-2;PVRL2)^{8,11}。TIGIT还结合额外的配体CD113(PVRL3)⁸。据报道,在NK细胞上DNAM-1和TIGIT的功能是平衡的(counter-balancing)¹²。在体外,DNAM-1加强NK细胞对广泛的肿瘤细胞的细胞毒性^{13,14},并且在体内对肿瘤的免疫监视至关重要^{13,15,16}。相反地,TIGIT携带ITIM基序,并且已经提出与抑制性Ly49或KIR与MHC I类分子的相互作用相似地防止自体组织损伤¹⁷。确实,在体外CD155结合(engagement)TIGIT已经显示了限制NK细胞的IFN γ 产生和细胞毒性^{18,19}。然而在体内,NK细胞生物学中TIGIT的作用相对于其他粘连蛋白受体DNAM-1和CD96仍有待评估。

[0005] 尽管在20年前已被克隆⁷,关于CD96,与DNAM-1和TIGIT共享CD155配体的其他Ig家族成员所知甚少^{20,21}。在人类中,CD96表达主要局限于NK细胞、CD8T细胞、和CD4T细胞⁷。CD96

的主要配体是CD155,但是还有报道CD96与CD111(粘连蛋白-1)有关,并且在促进NK和T细胞粘附中起作用^{21,22}。

发明内容

[0006] 出人意料地,本发明人已经发现了CD96充当T细胞和NK细胞抗肿瘤功能的负调节因子。相应地,本发明广泛涉及试剂的用途,所述试剂至少部分封闭或抑制CD96,从而减少或缓解CD96介导的免疫抑制,在哺乳动物中提高或恢复免疫监视。在某些实施方案中,这可促进至少对CD96部分封闭或抑制应答的疾病或病症的治疗,例如癌症和/或病毒感染。

[0007] 在第一方面中,本发明提供了一种在哺乳动物中减少或缓解免疫抑制的方法,所述方法包括在一种或更多种哺乳动物的细胞中至少部分抑制或减少CD96活性的步骤,从而在哺乳动物中缓解免疫抑制以及或提高或恢复免疫监视。

[0008] 适当地,在哺乳动物中抑制或减少CD96活性的步骤不包括或至少不依赖于杀伤哺乳动物中表达CD96的细胞。在一些实施方案中,在哺乳动物中抑制或减少CD96活性的步骤包括在一种或更多种表达CD96的哺乳动物的细胞中抑制或减少CD96结合CD155和/或细胞内信号传导。在一些实施方案中,在哺乳动物中抑制或减少CD96活性的步骤包括去除和/或下调细胞表面表达的CD96。

[0009] 在一个具体的实施方案中,在哺乳动物中抑制或减少CD96活性的步骤包括增加或提高一种或更多种细胞因子或趋化因子的表达、产生和/或分泌。优选地,所述细胞因子是干扰素 γ (IFN- γ)。典型地,一种或更多种哺乳动物的细胞是T细胞,包括CD4⁺和CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NKT细胞、以及自然杀伤(NK)细胞。

[0010] 在一个优选的实施方案中,所述方法在哺乳动物中缓解免疫抑制和/或提高或恢复免疫监视,从而在哺乳动物中治疗或预防癌症或癌症转移。

[0011] 在其他实施方案中,所述方法在哺乳动物中缓解免疫抑制和/或提高或恢复免疫监视,从而在哺乳动物中治疗或预防病毒感染。

[0012] 在第二方面中,本发明提供了一种筛选、设计、工程化或者生产CD96抑制试剂的方法,所述方法包括测定候选分子是否能够至少部分抑制或减少CD96活性、从而在哺乳动物中缓解免疫抑制和/或提高或恢复免疫监视的步骤。

[0013] 在第三方面中,本发明提供了一种根据第二方面的方法筛选、设计、工程化或者生产的CD96抑制试剂。

[0014] 在一个实施方案中,所述CD96抑制试剂是抗体或抗体片段。

[0015] 在一个具体地实施方案中,所述CD96抑制试剂是一种抗癌症试剂。

[0016] 在另一个具体地实施方案中,所述CD96抑制试剂是一种抗病毒试剂。

[0017] 在第四方面中,本发明提供了根据本发明第三方面的CD96抑制试剂用于根据第一方面的方法的用途。

[0018] 适当地,根据上述的方面,所述哺乳动物是人类。

[0019] 除非文中另有要求,术语“包括(comprise)”、“包含(comprises)”和“含有(comprising)”、或类似术语旨在表示非排他性的包括,如此,要素和特征的列举不仅包括阐明的或列举的要素,但可能包括其他未列举或阐明的要素或特征。

[0020] 本文所使用的不定冠词“一个(a)”和“一种(an)”指的是包含或单数或复数要素或

特征,并且不应作为表示或定义为“单一(one)”或“单独(single)”要素或特征。

附图说明

[0021] 图1:CD96与DNAM-1竞争结合CD155。a、b通过流式细胞术分析所示的来自C57BL/6WT(浅灰)和CD96^{-/-}小鼠(深灰)的脾淋巴细胞群的CD96的表达。显示来自3个实验中的一个代表性实验的3只小鼠的代表性FACS柱状图(a)和平均值±SD(b)。c、d在新鲜分离的或使用IL-2(1000U/ml)激活48小时的野生型脾NK细胞上测定CD96、DNAM-1和TIGIT的表达。e.通过流式细胞术,在所示的浓度评估偶联有AF-647的小鼠CD155-Fc与新鲜分离自WT、CD96^{-/-}、DNAM-1^{-/-}或DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-}小鼠的纯化的NK细胞的结合。f.在存在抗CD96和或抗DNAM-1mAb时,在纯化的WT NK细胞上分析偶联有AF-647(10μg/ml)的CD155-Fc的结合。g.在存在50μg/ml的对照Ig、重组CD96或TIGIT-Fc时,分析在BMDC的细胞表面上标记有AF-647(0.5-10μg/ml)的DNAM-1-Fc的结合。c-g.显示来自至少3个实验中的一个代表性实验的一式三份的孔的代表性FACS柱状图和平均值±SD。***p<0.001T检验(Student T text)。

[0022] 图2:CD155结合CD96调节NK细胞IFN-γ的产生。CD96结合CD155-Fc限制通过外源性细胞因子(a、b、d)和NK细胞受体(c)诱导的NK细胞IFN-γ的产生。a、b、d.使用包被有或没有CD155-Fc(0.5μg/孔)的板,我们分析了在存在或不存在抗CD96抗体(50μ/ml)时,新鲜纯化的CD96^{-/-}、TIGIT^{-/-}和WT NK细胞对IL-12(25-100pg/ml)和IL-18(50ng/ml)应答时细胞内产生的IFN-γ。c.使用包被有抗NK-1.1(2.5μg/孔)和CD155-Fc(0.5μg/孔)的板,我们分析了被IL-2激活的来自CD96^{-/-}和WT小鼠的NK细胞细胞内产生的IFN-γ。显示来自3个实验中的一个代表性实验的一式三份的孔的代表性FACS柱状图(a)和平均值±SD(b、c、d)。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001,T检验。

[0023] 图3:CD96限制依赖NK细胞的肿瘤免疫监视。a、b.CD96和DNAM-1在B16F10转移的控制中具有相反的作用。a.2x 10⁵B16F10细胞静脉注射至WT、CD96^{-/-}、DNAM-1^{-/-}和DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-}小鼠,并且在14天后定量在肺中的转移负荷。3个实验中的代表性实验。b.图片显示在注射2x 10⁵和5x 10⁵B16F10细胞两周后WT和CD96^{-/-}小鼠的肺。两个实验中的代表性实验。c.在B16F10细胞表面CD96和TIGIT与DNAM-1竞争结合CD155。存在50μg/ml的对照Ig、重组CD96或TIGIT-Fc时,分析在B16F10细胞的细胞表面的标记有AF-647(0.5-20μg/ml)的DNAM-1-Fc的结合。显示来自3个实验中的一个代表性实验的一式三份的孔的代表性FACS柱状图和平均值±SD。d.以所示的效靶比,在B16F10细胞和来自WT、DNAM-1^{-/-}和CD96^{-/-}小鼠的IL-2激活的NK细胞之间执行4小时的⁵¹Cr释放试验。实心圆代表WT NK细胞,空心圆代表CD96^{-/-}NK细胞以及实心方块代表DNAM-1^{-/-}NK细胞。e-h.在NK细胞介导的MCA诱导的纤维肉瘤的免疫监视中,CD96和DNAM-1具有相反的作用。e-h使用MCA(100μg/小鼠)注射15-30只雄性WT、DNAM-1^{-/-}和CD96^{-/-}和DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-}小鼠的组。显示具有肉瘤的个体小鼠的生存(e-g)和生长曲线(h)。f.使用如材料和方法中定义的抗CD96、抗DNAM-1或者抗CD155mAb处理WT小鼠。g.使用100μg MCA注射WT和CD96^{-/-}小鼠,并且使用对照抗体、抗IFN-γ抗体、或者抗去唾液酸(asialo)GM1处理。*p<0.05Mantel-Cox检验。

[0024] 图4:抗CD96mAb具有单独试剂活性并且提高抗PD1的抗肿瘤应答。使用AT3-OVA^{dim}肿瘤细胞(10⁶细胞)皮下注射C57BL/6野生型(WT)小鼠,并且在第16、20和24天使用抗CD96mAb(3.3,250μg,i.p.)或者抗PD-1(RMP1-14,250μg,i.p.)腹腔注射处理。显示每组5只

小鼠的平均值 $\pm$ SEM(mm²)(*:p<0.05通过Mann-Whitney检验与单独cIg对比)。

[0025] 图5:抗CD96mAb提高通过阿霉素(DOX)化疗产生的抗肿瘤应答。使用AT3-OVA^{dim}肿瘤细胞(10⁶细胞)皮下注射C57BL/6野生型(WT)、DNAM-1^{-/-}和CD96^{-/-}小鼠,并且在第14天使用对照PBS或者DOX(50微升,2mM,瘤内)处理。WT小鼠的一些组还在第12、14、18、21、24和28天接受抗CD96mAb(3.3,250 μ g,i.p.)或者抗DNAM-1(480.1,250 μ g,i.p.)的腹腔注射。显示每组5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM(mm²)。

[0026] 图6:宿主CD96缺陷提高阿霉素(DOX)化疗的抗肿瘤应答。使用AT3-OVA^{dim}肿瘤细胞(10⁶细胞)皮下注射C57BL/6野生型(WT)、DNAM-1^{-/-}和CD96^{-/-}小鼠,并且在第16天使用对照PBS或者DOX(50微升,2mM,瘤内)处理。显示每组5只小鼠的平均值 $\pm$ 标准误(mm²)。

[0027] 图7:抗CD96mAb提高由阿霉素(DOX)化疗产生的抗肿瘤应答。使用AT3-OVA^{dim}肿瘤细胞(10⁶细胞)皮下注射C57BL/6野生型(WT)小鼠,并且在第16天使用对照PBS或者DOX(50微升,2mM,瘤内)处理。WT小鼠的一些组还在第16、20和23天接受抗CD96mAb(3.3,250 μ g,i.p.)的腹腔注射。显示每组5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM(mm²)(*:p<0.05通过Mann-Whitney检验与单独cIg对比)。

[0028] 图8:早期抗CD96mAb提高由抗PD-1和抗CTLA-4mAb产生的抗肿瘤应答。使用B16-OVA黑色素瘤细胞(10⁵细胞)皮下注射C57BL/6野生型(WT)小鼠,并且在第1、5和9天使用抗CD96mAb(3.3,250 μ g,i.p.)、抗PD-1mAb(RMP1-14,250 μ g,i.p.)、抗CTLA-4(UC10-4F10,250 μ g,i.p.)、抗D96/抗PD-1 mAb(每个250 μ g,i.p.)、抗CD96/抗CTLA-4mAb(每个250 μ g,i.p.)或者对照Ig(cIg)(2A3,250 μ g,i.p.)的腹腔注射处理。显示每组5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM(mm²)(*:p<0.05通过Mann-Whitney检验与单独抗CD96对比)。

[0029] 图9:后期抗CD96mAb提高由抗PD-1mAb产生的抗肿瘤应答。使用B16-OVA黑色素瘤细胞(10⁵细胞)皮下注射C57BL/6野生型(WT)小鼠,并且在第16、20和24天使用抗CD96mAb(3.3,250 μ g,i.p.)、抗PD-1mAb(RMP1-14,250 μ g,i.p.)、抗CTLA-4(UC10-4F10,250 μ g,i.p.)、抗CD96/抗PD-1 mAb(每个250 μ g,i.p.)、抗CD96/抗CTLA-4mAb(每个250 μ g,i.p.)或者对照Ig(cIg)(2A3,250 μ g,i.p.)的腹腔注射处理。显示每组5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM(mm²)(*:p<0.05通过Mann-Whitney检验与单独抗CD96对比)。

[0030] 图10:宿主CD96促进B16F10肺转移。使用B16F10黑色素瘤细胞(10⁵细胞)静脉注射C57BL/6野生型(WT)、DNAM-1^{-/-}、CD96^{-/-}和DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-}小鼠,并且在14天后通过在肺表面计数克隆定量在肺中的转移负荷。显示每组9-17只小鼠的平均值 $\pm$ SEM(*:p<0.05通过Mann-Whitney检验与WT对比)。

[0031] 图11:宿主CD96促进RM-1肺转移。使用RM1前列腺癌细胞(10⁴细胞)静脉注射C57BL/6野生型(WT)、DNAM-1^{-/-}、CD96^{-/-}和DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-}小鼠,并且在14天后通过在肺表面计数克隆定量在肺中的转移负荷。显示每组10-15只小鼠的平均值 $\pm$ SEM(*:p<0.05通过Mann-Whitney检验与WT对比)。

[0032] 图12:宿主CD96促进3LL肺转移。使用3LL肺癌细胞(10⁵细胞)静脉注射C57BL/6野生型(WT)、DNAM-1^{-/-}、CD96^{-/-}和DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-}小鼠,并且在14天后通过在肺表面计数克隆定量在肺中的转移负荷。显示每组5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM(*:p<0.05通过Mann-Whitney检验与WT对比)。

[0033] 图13:抗CD96单独和与T细胞检查点封闭结合压制B16F10肺转移。使用B16F10黑色

素瘤细胞(10^5 细胞)静脉注射C57BL/6野生型(WT)小鼠。在肿瘤接种后第0和第3天,使用抗CD96mAb(3.3, 250 μ g, i.p.)、抗PD-1mAb(RMP1-14, 250 μ g, i.p.)、抗CTLA-4(UC10-4F10, 250 μ g, i.p.)、抗CD96/抗PD-1 mAb(每个250 μ g, i.p.)、抗CD96/抗CTLA-4mAb(每个250 μ g, i.p.)或者对照Ig(cIg)(2A3, 250 μ g, i.p.)的腹腔注射处理。并且在14天后通过在肺表面计数克隆定量在肺中的转移负荷。显示每组5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM(*: $p < 0.05$ 通过Mann-Whitney检验与单独抗CD96对比)。

[0034] 图14:抗CD96单独和与T细胞检查点封闭结合压制RM-1肺转移。使用RM-1前列腺癌细胞(10^4 细胞)静脉注射C57BL/6野生型(WT)小鼠。在肿瘤接种后第0和第3天,使用抗CD96mAb(3.3, 250 μ g, i.p.)、抗PD-1mAb(RMP1-14, 250 μ g, i.p.)、抗CTLA-4(UC10-4F10, 250 μ g, i.p.)、抗CD96/抗PD-1 mAb(每个250 μ g, i.p.)、抗CD96/抗CTLA-4mAb(每个250 μ g, i.p.)或者对照Ig(cIg)(2A3, 250 μ g, i.p.)的腹腔注射处理。并且在14天后通过在肺表面计数克隆定量在肺中的转移负荷。显示每组5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM(*: $p < 0.05$ 通过Mann-Whitney检验与单独抗CD96对比)。

[0035] 图15:后期抗CD96mAb提高由抗PD-1mAb产生的抗肿瘤应答。使用MC38-OVA^{dim}结肠腺癌细胞(10^6 细胞)皮下注射C57BL/6野生型(WT)小鼠,并且在第14、18、22和26天使用抗CD96mAb(3.3, 250 μ g, i.p.)、抗PD-1mAb(RMP1-14, 250 μ g, i.p.)、抗CTLA-4(UC10-4F10, 250 μ g, i.p.)、抗CD96/抗PD-1 mAb(每个250 μ g, i.p.)、抗CD96/抗CTLA-4mAb(每个250 μ g, i.p.)或者对照Ig(cIg)(2A3, 250 μ g, i.p.)的腹腔注射处理。显示每组5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM(mm^2)(*: $p < 0.05$ 通过Mann-Whitney检验与单独抗CD96对比)。

[0036] 图16.抗CD96单独对AT3-OVA^{dim}乳腺癌的抗肿瘤作用的机制。(A-B)使用AT3-OVA^{dim}乳腺癌(1×10^6)皮下注射C57BL/6野生型(WT)和pfp^{-/-}小鼠。在(A)第16、20和24天或者在(B)接种肿瘤后12、16和18天,小鼠腹腔注射cIg(250 μ g, i.p.)或者抗CD96mAb(250 μ g, i.p.)处理。一些小鼠的组(A)在肿瘤接种后第14、16和23天使用cIg、抗CD4/抗CD8 β (100 μ g, i.p.)或者抗asGM1(100 μ g, i.p.)处理,或者(B)在肿瘤接种后第10、12和18天使用cIg、抗IFN- γ (250 μ g, i.p.)处理。接着监测小鼠的肿瘤生长。显示每组5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM(mm^2)(*: $p < 0.05$ 通过Mann-Whitney检验比较cIg处理的小鼠和抗CD96mAb处理的小鼠)。

[0037] 图17.在体外NK细胞的激活。为分析来自人类的NK细胞产生的IFN γ ,将96孔U底板使用重组人类CD155-Fc嵌合体(0.25 μ g/孔)在4 $^{\circ}$ C包被过夜。在三次洗涤后,新鲜分离自血沉棕黄层(buffy coats)并经FACS分选的 2.5×10^4 人类NK细胞,在存在或不存在人类抗CD96抗体(克隆NK92.39, 50 μ g/ml)时,接种至添加有人类IL-2(10ng/ml)、IL-15(100ng/ml)和IL-18(100ng/ml)的完全RPMI。还在不含有CD155-Fc包被的孔中设置培养。在孵育24小时后,收集细胞,并且通过流式细胞术分析IFN γ 的产生。所有情况以一式三份进行,并且误差条代表 $\pm$ SEM。(A)使用IL-12、18和15的流式细胞术结果;以及(B)来自不同供体(非在17A中显示的供体1)的结果显示IFN γ 阳性NK细胞的比例。

[0038] 图18.人类CD96mAb(NK92.39)与人类NK细胞的结合减少NK细胞表面CD96存在的水平。使用人类NK细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec.),通过阴性选择纯化来自外周血单个核细胞(PBMC)的总NK细胞。接着使用羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE; Biolegend)标记分离的NK细胞用以测量细胞增殖。CFSE标记的NK细胞以 5×10^4 细胞/孔接种于96孔U底板,并且在以30 μ

g/ml的对照IgG或者抗CD96mAb(克隆NK92-39)存在时,以所示浓度(10单位/ml和25单位/ml)使用重组IL-2刺激。评估NK细胞的增殖的变化(A)或者表面CD96的存在/不存在;并且(B)在第3天和第6天,使用BD FACS Canto II(BD Biosciences)并且使用FlowJo(Tree Star)实施分析。

具体实施方式

[0039] 本发明至少部分地基于意外的发现:即CD96被静息NK细胞和T细胞亚群高表达,并且与DNAM-1竞争结合于在静息NK细胞上的CD155。使用CD96^{-/-}小鼠,证明CD96通过与DNAM-1竞争结合CD155以及还通过直接的抑制,在体外和体内降低或压制NK细胞产生的IFN- γ 。此外CD96^{-/-}小鼠显示对作为致癌作用的指标的3'-甲基胆蒎(MCA)诱导的肿瘤形成、或者B16F10(黑色素瘤)、RM-1(前列腺癌)、3LL(肺癌)实验性转移更有抵抗力。在人类NK细胞中,施用抗CD96抗体似乎除去细胞表面CD96或导致细胞表面CD96的缺失、和/或CD96细胞表面表达的下调。基于这些观察,提出CD96通常充当T细胞和NK细胞抗肿瘤功能的负调节因子,特别是虽然非唯一地通过IFN- γ 产生和/或分泌的压制。相应地,本发明提供了缓解或减少CD96的负免疫调节功能的方法,从而促进或恢复特别是通过T细胞和NK细胞的免疫监视,从而治疗或预防癌症、癌症细胞转移和/或病毒感染。

[0040] 因此,本发明的一个方面提供了一种在哺乳动物中减少或缓解免疫抑制的方法,所述方法包括在一种或更多种哺乳动物的细胞中至少部分抑制或减少CD96活性的步骤,从而在哺乳动物中缓解免疫抑制和/或提高或恢复免疫监视。

[0041] 在CD96的上下文中“缓解免疫抑制”表示以压制或抑制一种或更多种通常表达CD96的细胞的免疫功能,至少部分消除、去除或克服CD96的正常活性或功能。典型地,一种或更多种通常表达CD96的细胞是T细胞,包括CD4⁺和CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NKT细胞、以及自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,缓解免疫抑制可能包括或涉及废除对外来病原体、显示外来病原体的宿主细胞(例如在自体MHC中显示外来病原体衍生的肽)和/或宿主的癌细胞或组织的外周耐受。

[0042] “提高或恢复免疫监视”表示至少部分提高或促进一种或更多种免疫系统的要素的能力以对外来病原体、显示外来病原体的宿主细胞(例如在自体MHC中显示外来病原体衍生的肽)和/或宿主的癌细胞或组织监测、检测和/或应答。适当地,免疫系统的要素是一种或更多种通常表达CD96的细胞,例如T细胞,包括CD4⁺和CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NKT细胞、以及自然杀伤(NK)细胞。

[0043] 在一种或更多种哺乳动物的细胞中至少部分抑制或减少CD96的活性可以通过对哺乳动物施用“CD96抑制试剂”来执行、促进或实现。CD96抑制试剂可以是具有或显示至少部分抑制或减少CD96的生物学活性的能力的任何分子。CD96的生物学活性包括结合CD155、细胞表面表达、诱发细胞内信号传导和/或刺激或诱导细胞因子或趋化因子的表达和/或分泌中的一种或更多种。优选地,所述细胞因子或趋化因子包括任何促炎细胞因子或趋化因子,包括MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、TNF- α 和IFN- γ ,而不仅限于此。优选地,所述细胞因子是IFN- γ 。

[0044] 如本文所公开,CD96是在人类中的跨膜蛋白,存在两种同种型。在急性髓性白血病中已检测到同种型1,且与同种型2相比包括额外的氨基酸。同种型2是在人类中更为常见的

形式,如在表1中所列出的,预测的同种型2的结构域体系结构具有三个(3)外部免疫球蛋白样结构域(结构域1、2和3)。人类CD96同种型1的氨基酸序列在SEQ ID NO:2中阐述。编码同种型2的核苷酸序列在SEQ ID NO:1中阐述。鼠科CD96以单一同种型存在,其氨基酸序列在SEQ ID NO:4中阐述。编码鼠科CD96的核苷酸序列在SEQ ID NO:3中阐述。鼠科CD96的外部免疫球蛋白样结构域(结构域1、2和3)同样在表1中列出。

[0045] 在一种优选的形式中,CD96抑制试剂与一种或更多种CD96的外部免疫球蛋白样结构域的氨基酸序列结合或者相互作用。例如CD96抑制试剂可以与结构域1;结构域2;结构域3;结构域1和结构域2;结构域1和结构域3;结构域2和结构域3;或者结构域1、结构域2和结构域3的氨基酸序列结合或者相互作用。

[0046] 在一个实施方案中,CD96抑制试剂与一种或更多种人类CD96同种型2的外部免疫球蛋白样结构域结合或者相互作用。

[0047] 还应意识到除了一种或更多种外部或细胞外免疫球蛋白样结构域以外,CD96抑制试剂可以与其他CD96结构域或者氨基酸序列结合或者相互作用。

[0048] 在一个实施方案中,CD96抑制试剂抑制、封闭或拮抗CD96和CD 155间的结合相互作用。仅作为实施例,CD96抑制试剂可以结合至CD96的细胞外结构域、或者其部分,该细胞外结构域、或者其部分能够与CD155相互作用(例如结合CD155或被CD155结合)从而至少部分抑制或封闭CD96结合于CD155。

[0049] 在另一个实施方案中,所述CD96抑制试剂是具有或显示抑制或减少CD96信号传导活性的能力的分子。CD96的信号传导活性的抑制或减少可以通过抑制、封闭或拮抗与CD155的结合相互作用或者可通过封闭CD96启动的信号传导,该信号传导通常在对CD155结合的应答时发生。作为实施例,CD96包含基于免疫受体酪氨酸的抑制性基序(ITIM)。ITIM是结构定义为包含酪氨酸(Y)残基,伴有部分保守的N-端(Y-2)和C-端(Y+3)残基的6氨基酸序列。基序一般但不限于是(S/I/V/LXYXXI/V/L),其中X是任意氨基酸。例如CD96的同种型1包含ITIM序列IKYTCTI,其中Y是残基566。

[0050] 已经提出了当与激活受体共同聚合时,ITIM被Src家族酪氨酸激酶磷酸化,使得它们募集含有Src同源2结构域的拮抗激活信号的磷酸酶(PTPases)。相应地,在一个实施方案中,所述CD96抑制试剂具有或显示抑制或减少通过CD96ITIM介导的CD96信号传导活性。优选地,通过CD96ITIM介导的CD96信号传导活性的抑制或减少能够增加或提高表达CD96的细胞的细胞因子(例如IFN- γ)表达、产生和/或分泌。

[0051] 在另一个实施方案中,CD96抑制试剂是去除细胞表面CD96和/或减少或下调细胞表面CD96表达的分子。

[0052] 所述CD96抑制试剂可以是一种蛋白(包括肽、抗体或抗体片段)、核酸(包括抑制性RNA分子,例如核酶、RNAi、miRNA和siRNA,而不仅限于此)、脂质、碳水化合物、有机小分子或者这些的任意组合(例如糖蛋白、脂蛋白、肽核酸等)。

[0053] 在一个具体的实施方案中,所述CD96抑制试剂是结合CD96的抗体或抗体片段。

[0054] 在一个优选地形式中,抗体或者抗体片段与一种或更多种CD96的外部或细胞外免疫球蛋白样结构域的氨基酸序列结合或者相互作用。例如抗体或抗体片段可以与结构域1;结构域2;结构域3;结构域1和结构域2;结构域1和结构域3;结构域2和结构域3;或者结构域1、结构域2和结构域3的氨基酸序列结合或者相互作用。

[0055] 在一个实施方案中,抗体与一种或更多种人类CD96同种型2的外部免疫球蛋白样结构域结合或相互作用。

[0056] 抗体以一种形式结合CD96并且至少部分封闭或抑制CD96结合于CD155。

[0057] 抗体可以是多克隆的或者单克隆的,天然的或者重组的。抗体片段包括Fab和Fab' 2片段,双体和单链抗体片段(例如scVs),而不仅限于此。抗体和抗体片段可以经修饰,以便生产或者起源自其他物种的抗体在施用至一个物种时对“外来”抗体不引起有害免疫应答。在人类中,这是已在其他物种中生产或者起源自其他物种的抗体的“人源化”。现有技术公知该方法,并且一般涉及重组“接枝”非人类抗体互补决定区(CDR)至人类抗体支架或骨架。

[0058] 适当地,在哺乳动物中抑制或减少CD96活性的步骤不包括在哺乳动物中杀伤表达CD96的细胞。在本文中,“杀伤”可指任何抗体介导的细胞毒机制,如补体介导的细胞裂解和抗体介导的细胞介导的细胞毒作用(ADCC),后者典型地通过自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞介导。就这一点而言,使用缺少Fc部分或具有突变的Fc部分的抗体片段可能是有利的。

[0059] 在哺乳动物中抑制或减少CD96活性的步骤可通过对哺乳动物施用CD96抑制试剂实现或促进。

[0060] “施用”表示通过具体的途径将CD96抑制试剂引入至哺乳动物。适当地,CD96抑制试剂的治疗有效量施用于哺乳动物。

[0061] 术语“治疗有效量”描述了在用该试剂治疗的哺乳动物中,足以实现期望的效果的指定试剂的量。

[0062] 一般地,本发明的方法在减少或缓解CD96介导的免疫抑制、压制或外周耐受中是有用的。适当地,所述方法促进治疗或预防一种或更多种疾病或病症,所述疾病或病症对至少部分封闭CD96介导的免疫抑制、压制或外周耐受是应答的。

[0063] 如本文所使用的“治疗(treating)”或者“治疗(treat)”或者“治疗(treatment)”指的是一种治疗性干预,治疗性干预至少部分消除或者改善了一种或更多种存在的或之前鉴定的疾病或病症的症状,所述疾病或病症对至少部分封闭CD96介导的免疫抑制、压制或外周耐受是应答的。

[0064] 如本文所使用的“预防(preventing)”或“预防(prevent)”或“预防(prevention)”指的是一种在疾病或病症的症状的开始之前启动的预防性处理,所述疾病或病症对至少部分封闭CD96介导的免疫抑制、压制或外周耐受是应答的,以便至少部分或暂时预防症状的出现。

[0065] 典型地,对至少部分封闭CD96介导的免疫抑制、压制或外周耐受是应答的疾病或病症是提高或恢复免疫监视能够使患有疾病或病症的受试者受益的任何疾病或病症。该疾病和病症可能包括那些能够被细胞介导的免疫所控制或压制的持久性疾病或病症。非限制性的实施例包括癌症和病毒感染。具体地,本发明所涉及的病毒感染包括持久的病毒感染,例如由人类免疫缺陷病毒(HIV)、EB病毒(EBV)、单纯疱疹病毒(HSV包括HSV1和HSV2)、人乳头瘤病毒(HPV)、水痘带状疱疹病毒(VSV)以及巨细胞病毒(CMV)引起的,而不仅限于此。

[0066] 在一个优选的实施方案中,所述方法在哺乳动物中减少或缓解免疫抑制,足以在哺乳动物中治疗或预防癌症或癌症转移。适当地,癌症可以是任何对至少部分封闭CD96介导的免疫抑制、压制或外周耐受应答的癌症。癌症可以是以实体肿瘤、肉瘤、淋巴瘤、骨髓

瘤、癌(carcinomas)、黑色素瘤、细胞瘤和脑膜瘤的形式,而不仅限于此。癌症的非限制性的实施例包括肾上腺、膀胱、骨、骨髓、脑、乳腺、宫颈、胆囊、神经节、胃肠道、心脏、肾脏、肝脏、肺、肌肉、卵巢、胰腺、脑垂体、甲状旁腺、前列腺、唾液腺、皮肤、脾、睾丸、甲状腺以及子宫的癌症。具体地,癌症的非限制性实施例包括结肠癌、肺癌和前列腺癌。在一些实施方案中,癌症是转移性癌症,其有能力迁移到机体内的另一位点、组织或器官,并且在该位点、组织或器官形成肿瘤。这可以随时间重复发生。本发明所涉及的一个具体的侵袭性转移性癌症是转移性黑色素瘤。

[0067] 还应当意识到癌症的治疗或预防的方法可以进一步包括与一种或更多种其他治疗试剂的共同施用,所述治疗试剂促进癌症治疗或预防。仅作为实施例,这些包括:化疗试剂,例如紫杉醇、阿霉素、甲氨蝶呤和顺铂,而不仅限于此;和/或生物治疗试剂,例如抗PD-1抗体(例如Nivolumab)和抗CTLA4抗体(例如Ipilimumab),而不仅限于此。还预期的是结合CD96和一种或更多种其他分子(包括但不限于PD-1和CTLA4)的双特异抗体。

[0068] 如现有技术公知地,一种或更多种促进癌症治疗或预防的其他试剂可以与CD96抑制试剂结合施用,或者分别地施用。

[0069] 在一些实施方案中,所述CD96抑制试剂可以是单独制剂,或者是与一种或更多种其他试剂以药物组合物的形式制剂。

[0070] 本领域技术人员容易确定施用于哺乳动物,包括人类施用的CD96抑制试剂的合适的剂量(单独或与其他治疗试剂共同)。

[0071] 适当地,药物组合物包含合适地药学可接受的载体、稀释剂或者赋形剂。

[0072] 优选地,药学可接受的载体、稀释剂或者赋形剂是适合施用于哺乳动物的,并且更优选地,施用于人类。

[0073] “药学可接受的载体、稀释剂或者赋形剂”表示可以在系统施用中安全地使用的固体或液体填充物、稀释剂或封装物质。根据具体的施用途径,可以使用在现有技术中公知的各种载体、稀释剂或者赋形剂。这些载体可选自:糖、淀粉、纤维素及其衍生物、麦芽、明胶、滑石、硫酸钙、植物油、合成油、多元醇、海藻酸、磷酸缓冲溶液、乳化剂、等渗盐水和盐(例如,包括盐酸盐、溴化物和硫酸盐的无机酸盐,例如乙酸盐、丙酸盐和丙二酸酯的有机酸)以及无致热原的水。

[0074] 描述药学可接受的载体、稀释剂或者赋形剂的有用的参考文献为雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)(马克出版有限公司(Mack Publishing Co.)NJ USA,1991)。

[0075] 可以利用任何安全的施用途径对受试者提供包含CD96抑制试剂的组合物。例如可以利用口服、直肠、胃肠外、舌下、口腔、静脉内、关节内、肌内、真皮内、皮下、吸入、眼内、腹腔内、脑室内、透皮等。

[0076] 本发明的进一步的方面提供了一种筛选、设计、工程化或者生产CD96抑制试剂的方法,所述方法包括测定候选分子是否能够至少部分抑制或减少CD96活性、从而在哺乳动物中缓解免疫抑制和/或提高或恢复免疫监视的步骤。

[0077] 本发明还提供了一种根据前述方面筛选、设计、工程化或者生产的CD96抑制试剂。

[0078] 候选分子可以是蛋白(包括肽、抗体和抗体片段)、核酸(包括但不限于抑制性RNA分子,例如核酶、RNAi、miRNA和siRNA)、脂质、碳水化合物、有机小分子或者这些的任意组合

(例如糖蛋白、脂蛋白、肽核酸等)。

[0079] 在一些实施方案中,候选调节因子可以是基于期望的或预测的结构特点或特征从头合理设计的或者经工程化的,这些结构特点或特征表明该候选调节因子能够封闭或者抑制一种或更多种CD96的生物学活性,例如结合CD155、细胞内信号传导和/或IFN- γ 的产生和/或分泌。在其他实施方案中,候选调节因子可以通过筛选分子库鉴定,而没有基于期望或预测的结构特点或特征的初始选择,这些结构特点或特征表明该候选调节因子能够封闭或者抑制一种或更多种CD96的生物学活性。该库可包括蛋白、肽、核酸、重组抗体或抗体片段(例如噬菌体展示文库)、碳水化合物和/或脂的随机地生成的或者定向的库(directed libraries),天然产生的分子的库和/或合成的有机分子的组合库。

[0080] 如现有技术公知,适用于候选调节因子的设计和/或筛选的技术的非限制性实施例可以利用检测分子结合相互作用的X射线晶体学、NMR光谱学、计算机辅助筛选结构数据库、计算机辅助建模或生物化学或生物物理技术。

[0081] 鉴定分子相互作用的生物物理和生物化学技术包括竞争放射配体结合试验、免疫共沉淀、基于荧光的试验,包括荧光共振能量转移(FRET)结合试验、电生理学、分析超速离心、标签转移、化学交联、质谱、微量热法、表面等离子体共振和基于光学生物传感器的方法,例如在CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds.Coligan等人(John Wiley& Sons,1997)中的20章提供。生物化学技术,例如双杂交和噬菌体展示筛选方法在CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds.Coligan等人(John Wiley&Sons,1997)中的19章提供。

[0082] 相应地,所述方法的初始步骤可包括鉴定多个候选分子,这些候选分子根据广泛的结构和/或功能属性(例如结合CD96的能力)所选择。

[0083] 所述方法可能进一步包括测量或检测对候选分子应答的一种或更多种CD96的生物学活性变化的步骤。这些可能包括CD155结合、细胞表面CD96的存在和不存在、细胞内信号传导、细胞因子和/或趋化因子的产生或分泌和/或在体内模型中对肿瘤挑战的保护。

[0084] 候选分子抑制CD155结合CD96可以通过现有技术已知的数个技术的任意测定,包括竞争放射性配体结合试验、表面等离子体共振(例如BIAcore™分析)、免疫共沉淀和候选抑制因子封闭CD155结合CD96能力的基于荧光的分析(例如通过流式细胞术,其中CD155标记有荧光团)。荧光团的非限制性实施例包括异硫氰酸荧光素(FITC)、别藻蓝蛋白(APC)、荧光素衍生物例如FAM和ROX、德克萨斯红(Texas Red)、异硫氰酸四甲基若丹明(tetramethylrhodamine isothiocyanate,TRITL)、藻红蛋白(R-Phycoerythrin,RPE)、Alexa和氟硼二吡咯(Bodipy)荧光素。

[0085] 或者,该基于荧光的分析包括FRET分析(例如一种蛋白偶联于供体荧光团,另一种偶联于受体荧光团),而不仅限于此。

[0086] 在一些实施方案中,细胞内信号传导可以在CD96水平直接测量,例如通过测量NK细胞或T细胞亚群表达的CD96的含SH2结构域的PTPases的募集。本发明的候选分子适当地防止或减少存在CD155时,CD96募集的含SH2结构域的PTPases。根据该实施方案,候选分子可至少部分抑制或防止CD96和CD155之间的结合,从而至少部分抑制或防止通过CD96的细胞内信号传导,和/或至少部分抑制或防止尽管结合CD155的通过CD96的细胞内信号传导。

[0087] 在其他实施方案中,候选分子对CD96的作用可以通过测量表达CD96的细胞所表

达、产生和/或分泌的一种或更多种细胞因子或趋化因子来测定。一般地,细胞因子或趋化因子表达产生和/或分泌的变化通过细胞因子mRNA的RT-PCR测量,位于细胞内的细胞因子或趋化因子蛋白的测量(例如通过使用细胞因子或趋化因子特异的抗体的免疫细胞化学)和/或例如通过流式细胞术细胞因子微球阵列术(Cytokine Bead Array)(例如来自BD Biosciences商业提供)测量分泌的细胞因子或趋化因子,通过使用细胞因子或趋化因子特异的抗体的ELISA和通过使用细胞因子或趋化因子应答细胞系的生物测定来测量分泌至细胞上清中的细胞因子和/或趋化因子。这些细胞因子可以是任何促炎细胞因子或趋化因子,包括MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、TNF- α 和IFN- γ ,而不仅限于此。优选地,所述细胞因子是IFN- γ 。

[0088] 候选CD96抑制试剂的作用可取决于CD96表达,包括细胞表面的表达和CD96基因表达。应当意识到在某些细胞中,例如NK细胞而不仅限于此,CD96抑制试剂可以引起或者促进CD96表达的去除、失去和/或下调。在一些实施方案中,因此可以包括在细胞表面去除、失去和/或下调CD96的表达。这可以由提高细胞表面CD96的内化作用或内吞和/或通过下调或者压制CD96基因表达引起。在一个具体的实施方案中,CD96细胞表面表达可以通过流式细胞术、免疫沉淀、免疫细胞化学或者免疫组织化学检测或者测量,如前所述典型地通过结合CD96的抗体或者抗体片段的方式。在一个具体的实施方案中,CD96基因表达可以通过核酸序列扩增(例如PCR包括定量和半定量PCR)或者核酸杂交技术例如Northern印迹测量。

[0089] 优选地,候选分子的CD96抑制作用可以使用体内肿瘤挑战模型测定。例如,使用表达CD96的小鼠的小鼠模型可以用于测定候选分子抑制或防止对施用致癌试剂(例如甲基胆蒎(MCA))应答的肿瘤形成和/或生长的能力。在另一个实施例中,使用表达CD96的小鼠的小鼠模型用于测定候选分子抑制或防止对肿瘤细胞(例如黑色素瘤、结肠腺癌、前列腺癌和乳腺癌,而不仅限于此)应答的肿瘤形成和/或生长的能力。其他小鼠模型可利用倾向于自发形成肿瘤的小鼠,肿瘤包括但不限于MMTV-多瘤、MT乳腺癌、DMBA/TPA诱导的皮肤癌、p53缺失的淋巴瘤/肉瘤以及TRAMP Tg前列腺癌。

[0090] 可以理解,在这个方面的方法可以通过实施多轮筛选、设计和生物学测试反复的实施。这可以包括候选分子在每一轮之前经结构修饰的情况,从而使候选分子“微调(fine-tuning)”。

[0091] 应当意识到所述方法可以以“高通量”、“自动化”或“半自动化”的方式实施,具体地,在候选分子鉴定和选择的早期阶段。

[0092] 在一个优选的实施方案中,所述候选分子是抗体或抗体片段。如上文中所述,抗体可以是多克隆的或者单克隆的,天然的或者重组的。抗体片段包括Fab和Fab'2片段,双体或单链抗体片段(例如scVs),而不仅限于此。可以查询适用于抗体生产、选择、纯化和使用的公知的方案例如在Coligan等人CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY(John Wiley&Sons NY,1991-1994)的2章中和Harlow,E.&Lane,D.Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,Cold Spring Harbor Laboratory,1988中找到,二者均通过参考文献包含在本文中。

[0093] 例如可以通过注射CD96或者其片段(例如肽)至生产物种以获得多克隆血清从而制备多克隆抗体,生产物种包括小鼠或兔。本领域技术人员公知生产多克隆抗体的方法。可使用的示范步骤例如在Coligan等人CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY,上文,以及在

Harlow&Lane,1988,上文中描述。

[0094] 可以使用标准方法生产单克隆抗体,例如包含在本文中参考文献的 Köhler & Milstein,1975,Nature 256,495文章中所描述,或者通过更多的其最近修订版本,例如在 Coligan等人CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY,上文中所描述,使用衍生于生产物种的永生化脾或其他抗体生产细胞,所述生产物种已使用本发明的一种或更多种分离的蛋白、片段、变体或衍生物接种。适当地,所述抗体或抗体片段适合用于施用给人类。在本文中,如前所述,抗体或抗体片段可以是生产自或者起源于另一物种的抗体或抗体片段的“人源化”形式。该方法在现有技术中公知,并且一般涉及重组“接枝”非人类抗体互补决定区(CDRs)至人类抗体支架或骨架。

[0095] 在一个优选的实施方案中,在施用于人类时,抗体或抗体片段不杀伤表达CD96的细胞。在本文中,“杀伤”可指抗体介导的细胞毒机制,如补体介导的细胞裂解和抗体介导的细胞介导的细胞毒作用(ADCC),后者典型地通过自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞介导。就这一点而言,可能有利地使用缺少Fc部分或具有突变的Fc部分的抗体片段(例如人源化抗体)。

[0096] 根据前述方面筛选、设计、工程化或者生产的CD96抑制试剂可以用于根据第一方面的方法中(例如作为抗癌剂试剂和/或抗病毒试剂),优选地,以如前所述的药物组合物的形式。

[0097] 因此,参考以下非限制性的实施例,本发明可很容易理解,并且付诸实际作用。

[0098] 实施例

[0099] 实施例1

[0100] CD96结合CD155以及在小鼠肿瘤模型中CD96抑制和敲除的作用

[0101] 材料和方法

[0102] 小鼠

[0103] 野生型C57BL/6小鼠购自沃尔特和伊莱扎霍尔医学研究所(Walter and Eliza Hall Institute for Medical Research)或ARC动物资源中心。C57BL/6CD96^{-/-}小鼠由Marco Colonna博士和Susan Gilfillan博士在华盛顿大学医学院(St Louis,MO,USA)如下产生。设计靶向构建体用两侧为loxP位点的MC1-neor基因替换CD96的外显子1和2(包括起始位点),电穿孔至E14.1(129P2/OlaHsd)胚胎干细胞中(图S1)。注射至C57BL/6囊胚后从两个克隆获得递送靶向等位基因的嵌合体。携带靶向等位基因的小鼠繁殖成在CMV启动子下表达Cre转基因的C57BL/6小鼠,从而删除MC1-neor基因(Schwenk等人,1995)。在每一代,通过10厘米间隔的多态性微卫星标记的全基因组筛选帮助下,CD96删除回交C57BL/6背景。CD96^{+/-}>99% C57BL/6小鼠杂交生成CD96^{-/-}小鼠。已经描述DNAM-1^{-/-}小鼠。DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-}通过CD96^{-/-}和DNAM-1^{-/-}小鼠杂交生成。饲养小鼠并在6-14周龄使用。所有实验经动物伦理委员会的批准。

[0104] 细胞培养

[0105] B16F10、RM-1、3LL、AT3、MC38和YAC-1细胞系在完全RPMI培养基(Gibco, Invitrogen,)中,即添加有10%FCS(Thermo Scientific)、L-谷氨酰胺(Gibco)、非必需氨基酸、丙酮酸钠、HEPES(Gibco)以及青霉素/链霉素(Gibco),在37℃5%的CO₂中生长。对于细胞毒性试验和IL-12/IL-18滴定实验,从脾收集原代NK细胞,使用小鼠NK细胞分离试剂盒

(Miltenyi Biotec)和AutoMACS(Miltenyi Biotec)分选,并且随后在添加有10%FCS、L-谷氨酰胺、青霉素/链霉素、非必需氨基酸(Gibco)、丙酮酸钠(Gibco)、HEPES(Gibco)、 β -2-巯基乙醇(Calbiochem)、以及1000IU/ml重组人类IL-2(Chiron Corporation)的RPMI培养基中培养5天。所有细胞在37℃5%的CO₂中孵育。

[0106] 在体内LPS挑战

[0107] 悬浮于PBS中的LPS(来自E.Coli 0127:B8, Sigma)以所述剂量腹腔注射至小鼠。对于生存曲线,每小时地检查小鼠脓毒症(sepsis)的症状。通过眼球(retro-orbital)或心脏采血,在不同时间点取来自这些小鼠的血清用于细胞因子的检测。还在不同时间点取脾以分析来自NK细胞的受体和配体的表达,以及细胞内IFN- γ 的表达。

[0108] 在体内肿瘤挑战

[0109] 小鼠B16F10或B16-OVA黑色素瘤、RM-1前列腺癌、3LL肺癌、MC38-OVA^{dim}结肠腺癌或AT3-OVA^{dim}乳腺癌分别以所示剂量皮下或静脉注射至WT、DNAM-1^{-/-}、CD96^{-/-}、或者DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-}小鼠,并且分别监测实体瘤生长或转移。如图例中所示实施处理。为监测实体瘤生长,通过卡尺测量明显的肿瘤长度和宽度计算确实的(ensuing)肿瘤的面积,针对时间制图。为监测转移的形成,细胞注射14天后,收集肺,放置在Bouin's固定剂中,并且使用解剖显微镜计数转移。

[0110] MCA诱导纤维肉瘤

[0111] WT、DNAM-1^{-/-}、CD96^{-/-}和DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-}小鼠在右侧肋腹皮下注射不同剂量的MCA(5-400 μ g,例如100 μ g MCA),并且随时间监测纤维肉瘤形成。此外,一些小鼠用对照抗体处理,通过使用抗去唾液酸(asialo)GM1(Wako化学品;在-1、0天以及随后每周直至第八周i.p.注射100 μ g)耗尽NK细胞,中和IFN- γ (H22,在-1、0天以及随后每周直至第八周i.p.注射250 μ g),中和CD155,中和DNAM-1或者CD96。

[0112] 树突状细胞(BMDC):NK细胞共培养试验

[0113] 如前述产生BMDC。简要地,我们从小鼠的股骨和胫骨收集骨髓细胞,并且在添加有10%FCS、L-谷氨酰胺、青霉素/链霉素、非必需氨基酸、丙酮酸钠、 β -2-巯基乙醇和250ng/ml GM-CSF(eBioscience)的DMEM中培养6天。从脾收集WT或者CD96^{-/-}NK细胞,并且FACS分选以通过NK1.1(PK136)和TCR β (H57-597)和CD3(17A2)抗体染色纯化。在试验当天收集NK细胞。对于试验设置,5x 10⁴BMDM接种于96孔U底板。接着以不同的滴度(2:1、1:1、0.5:1、和0.25:1)加入NK细胞至BMDM。试验中始终包括仅BMDM和仅NK作为对照。所有细胞一经接种,每孔注入适量的培养基,以使各孔之间体积相等。接着加入100ng/ml的LPS至孔内持续2h,接着加入5mM纯化的ATP(Sigma)持续30分钟。在37℃5%CO₂中执行。试验中还包括仅LPS和仅ATP对照作为对照。在使用ATP 30分钟后,收集上清并存储于-20℃直至分析。

[0114] ⁵¹Cr细胞毒性试验

[0115] 使用标准的⁵¹Cr细胞毒性试验以分析WT和CD96^{-/-}NK细胞杀伤靶标的能力。简要地,标记有100 μ Ci的⁵¹Cr的20,000靶标加入V底板,并且接着以确定的效靶比添加NK细胞至靶标。在37℃5%CO₂中4小时后,收集上清,并且通过 γ 计数器(Wallac Wizard)定量⁵¹Cr的水平。使用公式(样本Cr释放-自发Cr释放)/(总Cr释放-自发Cr释放)x 100来确定特异性杀伤百分比。

[0116] 细胞因子检测

[0117] 在血清或上清中除IL-18以外的所有细胞因子的检测通过使用细胞微球阵列(Cytometric Bead Array, CBA)技术(BD Biosciences)实现。使用Canto II或者LSRII流式细胞术分析仪(BD Biosciences)完成采集(acquisition)。使用FCAP阵列软件执行分析。根据生产商说明书(MRL)通过ELISA检测IL-18。对于细胞内细胞因子检测,从肝脏获得分离的淋巴细胞,表面标记物染色,固定并使渗透(permeabilised)(BD Biosciences),并且用抗IFN- γ 抗体(XMG1.2)染色。

[0118] 流式细胞术分析和分选

[0119] 免疫细胞内稳态和CD96/CD155表达的分析:不同的器官(淋巴结、肺、脾、骨髓和肝脏)被加工成单淋巴细胞悬液,悬液中包括红细胞裂解物。起初 1×10^6 和 5×10^6 之间的细胞经过与2.4G2的孵育,用以在利用特异性抗体之前封闭非特异Fc抗体结合。为分析NK细胞内稳态和IFN- γ 产生,使用以下抗体:抗小鼠-NK1.1、-TCRB、-CD27(LG.7F9)、-CD11b(M1/70)、以及-IFN- γ 。对于T细胞:抗小鼠-TCRB、-CD8(53-6.7)和-CD4(RM4-5)。对于B细胞:抗小鼠-B220(RA3-6B2)、-CD19(1D3)。对于NKT细胞:负载有 α -半乳糖神经酰胺(α -galactosylceramide)的小鼠CD1d四聚体(由Dale Godfrey教授友善提供,墨尔本大学)、抗小鼠-TCRB或者-CD3、-CD4、和-NK1.1。对于巨噬细胞:抗小鼠-F4/80(BM8)和-CD11b。对于中性粒细胞:抗小鼠-Ly6G(1A8)和-CD11b。对于传统DC:抗小鼠-MHC II(M5/114.15.2)和-CD11c(N418)。对于 $\gamma\delta$ T细胞:抗小鼠- $\gamma\delta$ TCR(GL3)和-CD3。为分析CD96和CD 155表达,根据使用的以上抗体混合物(cocktails)连同抗小鼠-CD96(3.3.3)或者抗小鼠-CD 155(4.24.3)对感兴趣的特异细胞类型设门(gated)。使用LSRII或者Canto II流式细胞术分析仪(BD Biosciences)完成采集。使用Flowjo(Treestar)实现分析。

[0120] 细胞分选

[0121] 如上所述准备和染色来自脾的天然NK细胞和巨噬细胞。这些细胞接着使用Aria II FACS分选仪(BD Biosciences)分选以纯化。

[0122] 统计学分析

[0123] 使用Graphpad Prism软件实现统计学分析。当p值等于或者小于0.05时认为数据是统计上显著的。所使用的统计学检验为非配对t检验(unpaired Student's t test)、Mann-Whitney t检验、和用于生存的Mantel-Cox检验。如图例中确定所使用的合适的检验。

[0124] 结果

[0125] CD96与DNAM-1竞争结合CD 155(图1),以及CD155结合CD96下调NK细胞产生的IFN- γ (图2)。在MCA处理的小鼠中,CD96限制依赖NK细胞的肿瘤免疫监视,并且促进实验性B16F10肺转移(图3)。

[0126] 图4中的数据显示抗CD96mAb具有单独试剂活性(即无抗PD1处理),同时还提高抗PD1的抗肿瘤应答。与图6相一致,抗CD96mAb处理还提高由阿霉素(DOX)化疗产生的抗肿瘤应答(图5和7),图6中在CD96缺陷宿主中观察到对阿霉素(DOX)化疗提高的抗肿瘤应答。关于图8和9,指定的早期或者后期抗CD96mAb提高由抗PD-1和抗CTLA-4mAb产生的抗肿瘤应答,并且特别地显示与抗PD-1的强协同作用。

[0127] 还研究了CD96在肿瘤转移的促进中的作用。在图10中,在C57BL/6野生型(WT)、DNAM-1^{-/-}、CD96^{-/-}和DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-}小鼠中研究B16F10肺转移的调节。在图11中,宿主CD96促进RM-1肺转移,在图12中,宿主CD96促进3LL肺转移。图13显示抗CD96mAb单独和与T细胞

检查点封闭的结合压制B16F10肺转移。在图14中,抗CD96mAb单独和与T细胞检查点封闭的结合压制RM-1肺转移。在图15中,抗CD96mAb提高由抗PD-1和抗CTLA-4mAb所产生的针对MC38结肠肿瘤的抗肿瘤应答,并且特别地显示与抗PD-1的强协同作用。

[0128] 实施例2

[0129] 用于鉴定抗CD96抗体的筛选试验

[0130] 前言

[0131] 以下试验可用于鉴定本发明中有用的抗体。第一个试验可用于鉴定能够封闭或抑制人类CD96和人类CD155之间的结合的人类抗体。第二个试验可用于检验所鉴定的抗体是否引起抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)。第三个试验接着能应用于指导候选并且涉及测定人类CD96抗体是否能够调节人类淋巴细胞效应功能。

[0132] 材料和方法

[0133] 试验1:CD96结合CD155

[0134] 用以防止CD155结合于表达CD96的细胞(例如NK细胞)的细胞表面的候选抗CD96抗体的能力将按以下检验。融合于人类IgG1的C端Fc区域的重组人类CD155(例如可从Sino Biological获得的CD155-Fc)将使用荧光团标记,例如Alexa Fluor 647(AF647),根据生产商说明书,使用Zenon人类IgG标记试剂盒(Molecular Probe)。从健康供体的外周血新鲜分离的NK细胞或者其他表达CD96的细胞将在不同浓度的抗CD96抗体或者对照Ig存在中,与AF647标记的CD155-Fc孵育(将收集细胞并且通过流式细胞术检验细胞表面AF647-CD155-Fc的结合)。通过其封闭CD 155-Fc结合于表达CD96的细胞的能力鉴定防止CD155细胞结合于表达CD96的细胞的抗体。

[0135] 试验2:ADCC试验

[0136] 在存在抗CD96抗体时,免疫细胞(例如NK细胞和/或T细胞)的生存将按以下分析。来自健康供体的外周血免疫细胞将通过Ficoll梯度分离而分离。免疫细胞将铺板于存在合适剂量的人类IL-2以及递增浓度的抗CD96mAb的96孔板中。表达CD96的细胞(例如NK细胞和/或T细胞)的存活和百分比将通过流式细胞术随时间分析。用于该试验的合适的商业可提供的试剂盒的非限制性实施例为Annexin V凋亡检测试剂盒。

[0137] 试验3:人类CD96抗体的人类白细胞效应功能的调节试验

[0138] 从健康供体收集新鲜血液样本。外周血单个核细胞(PBMC)将通过以Ficoll-Paque密度梯度离心制备。通过磁性激活细胞分选,从PBMC中获得高纯度CD3-CD56+ NK细胞。为分析CD96影响人类NK细胞产生IFN- γ 的能力,96孔U底板将用重组人类CD155-Fc嵌合体(Sinb Biological股份有限公司;0.25 μ g/孔)或者用无关人类IgG1抗体在4 $^{\circ}$ C包被过夜。新鲜纯化的人类NK细胞接着将铺板于添加有人类IL-12、IL-18和可选地IL-15的完全RMPI介质中24小时,并且在不同的培养中分析细胞内含物和上清中IFN- γ 的水平。或者,人类NK细胞将在包被有抗NKG2D、抗NKp46、抗NKp30或者抗CD16抗体的孔中刺激24小时,用以分析CD96信号传导与其他NK细胞受体相互作用的能力。将待检验的抗人类CD96抗体或对照抗体在上述细胞因子或抗体之前加入培养,以确认这些检验的抗人类CD96抗体提高人类NK细胞产生IFN- γ 的能力。在IFN- γ 产生中高于对照的统计学增加将被认为是显著的。

[0139] 实施例3

[0140] 通过抗CD96抗体调节小鼠NK细胞功能的试验

[0141] 还将以调节CD96信号传导活性的能力筛选额外的抗小鼠CD96抗体。为分析小鼠NK细胞产生的IFN- γ , 96孔U底板将用重组小鼠CD155-Fc嵌合体(Sinb Biological股份有限公司; 0.25 μ g/孔)或者用无关人类IgG1抗体在4℃包被过夜。用PBS洗涤3次后, 来自所示小鼠品系的新鲜纯化的NK细胞将铺板于添加有小鼠IL-12(ebiosciences; 25-100pg/ml)和小鼠IL-18(R&D; 50ng/ml)的完全RMPI介质24小时。或者, IL-2激活的NK细胞将在包被有抗NK1.1(PK136; 0.125 μ g/孔)的孔中刺激6小时。在不同的时间点, 将加入抗小鼠CD96抗体(50-200 μ g/ml)或者对照抗体用以测定是否如通过CBA分析所测量的, 这些提高了NK细胞的IFN- γ 产生。

[0142] 实施例4

[0143] 小鼠和人类抗CD96抗体的生产

[0144] 人类CD96是一种跨膜蛋白, 其存在两种同种型。在急性髓性白血病中已检测到同种型1, 与同种型2相比包括额外的氨基酸。同种型2是在人类中常见的形式, 如在表1中所列出的, 预测的同种型2的结构域体系结构具有三个(3)外部免疫球蛋白样结构域(结构域1、2和3)。优选地, 本发明中使用针对同种型2的抗体。在NCBI一致序列号CCDS2958.1中给出了同种型2的核酸和氨基酸序列(分别为SEQ ID NOS:1和2)。

[0145] SEQ ID NO:1人类CD96CDNA同种型2。

[0146]

```
ATGGAGAAAAAATGGAAATACTGTGCTGTCTATTACATCATCCAGATACATTTTGTCAAGGGAGTTTGGGAAAAAAC
AGTCAACACAGAAGAAAATGTTTATGCTACACTTGGCTCTGATGTCAACCTGACCTGCCAAACACAGACAGTAGGCT
TCTTCGTGCAGATGCAATGGTCCAAGGTCACCAATAAGATAGACCTGATTGCTGTCTATCATCCCCAATACGGCTTC
TACTGTGCCTATGGGAGACCCTGTGAGTCACTTGTGACTTTCACAGAACTCCTGAGAATGGGTCAAAATGGACTCT
GCACTTAAGGAATATGTCTTGTTCACTCAGTGAAGGTACGAGTGTATGCTTGTTCTGTATCCAGAGGGCATTGAGA
CTAAAATCTACAACCTTCTCATTCAGACACACGTTACAGCAGATGAATGGAACAGCAACCATACGATAGAAATAGAG
ATAAATCAGACTCTGGAAATACCATGCTTTCAAAATAGCTCCTCAAAAATTTTCATCTGAGTTCACCTATGCATGGTC
GGTGGAGGATAATGGAACCTCAGGAAACACTTATCTCCCCAAATCACCTCATCAGCAATTCCACATTACTTAAAGATA
GAGTCAAGCTTGGTACAGACTACAGACTCCACCTCTCTCCAGTCCAAATCTTCGATGATGGGCGGAAGTTCTCTTGC
CACATTAGAGTCGGTCTTAACAAAATCTTGAGGAGCTCCACCACAGTCAAGGTTTTTGCTAAACCAGAAATCCCTGT
GATTGTGGAATAAATCCACGGATGTCTTGGTAGAGAGAAGATTTACCTGCTTACTAAAGAATGTATTTCCCAAAG
CAAATATCACATGGTTTATAGATGGAAGTTTTCTTCATGATGAAAAAGAAGGAATATATATTACTAATGAAGAGAGA
AAAGGCAAAGATGGATTTTTGGAAGTGAAGTCTGTTTAAACAAGGTACATAGTAATAAACCAGCCCAATCAGACAA
CTTGACCATTTGGTGTATGGCTCTGTCTCCAGTCCCAGGAAATAAAGTGTGGAACATCTCATCAGAAAAGATCACTT
TTCTCTTAGGTTCTGAAATTTCTCAACAGACCCTCCACTGAGTGTTACAGAATCTACCCTTGACACCCAACCTTCT
CCAGCCAGCAGTGTATCTCCTGCAAGATATCCAGCTACATCTTCAGTGACCCTTGTTAGATGTGAGTGCCTTGAGGCC
AAACACCACTCCTCAACCCAGCAATTCCAGTATGACTACCCGAGGCTTCAACTATCCCTGGACCTCCAGTGGGACAG
ATACCAAAAAATCAGTTTCACGGATACCTAGTGAAACATACAGTTCATCCCCGTCAGGTGCAGGCTCAACACTTCAT
GACAATGTCTTTACCAGCACAGCCAGAGCATTTTCAGAAGTCCCCACAACCTGCCAATGGATCTACGAAAATAATCA
CGTCCATATCACTGGTATTGTGGTCAATAAGCCCAAAGATGGAATGTCCTGGCCAGTGATTGTAGCAGCTTTACTCT
TTTGCTGCATGATATTGTTTGGTCTTGGAGTGAGAAAATGGTGTGAGTACCAAAAAGAAATAATGGAAGACCTCCA
CCTTTCAAGCCACCACCACCTCCCATCAAGTACACTTGCATTCAAGAGCCCAACGAAAGTGATCTGCCTTATCATGA
```

GATGGAGACCCTCTAG

[0147] SEQ ID NO:2人类CD96蛋白序列同种型2。

[0148]

MEKKWKYCAVYII IQIHFKGVWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQTQTVGFFVQMWSKVTNKIDLI AVYHPQYGF
Y CAYGRPCESLVTFTETPENGSKKTLHLRNMSCSVSGRYECMLVLYPEGIQTKIYNLLIQTHVTADEWNSNHTIEIE
INQTL EIPCFQNSSSRISSEFTYAWSVEDNGTQETLISQNHLSNSTLLKDRVKLGT DYRLHLSPVQIFDDGRKFSC
HIRVGP NKILRSSTTVKVFAPKEIPVIVENNSTDV LVERRFTCLLNVPKANITW FIDGSFLHDEKEGIYITNEER
KGKDG FLELKSVLTRVHSNKPAQSDNLT IWCMA LSPVPGNKVWNISSEKITFLLGSEISSTD PPLSVTESTLDTQPS
PASSVSPARYPATSSVTLVDVSALRPNTTPQPSNSSMTTRGFNYPWTSSGTDTKKSVSRIPSETYSSSPSGAGSTLH
DNVFTSTARAFSEVPTTANGSTKTNHVHITGIVVNKPKDGMSPVIVAALLFCCMILFGLGVRKWCQYQKEIMERPP
PFKPPPPPIKYTCIQEPNESDLPHYEMETL

[0149] 小鼠CD96蛋白同样是一种跨膜蛋白,但是在小鼠中仅已知单一转录/同种型,如在
SEQ ID NOs:3和4中显示

[0150] SEQ ID NO:3小鼠cDNA

[0151]

ATGGGGAGAAAATGGACATATTGTGTTGTTTACACCATCATCCAGATACAGTTTTTCAGGGGAGTGTGGGAAGAGCT
ATTCAATGTTGGAGATGACGTGTATGCTCTACCTGGTTCTGACATCAACTTGACCTGCCAAACAAAGGAGAAAACT
TCTTGGTACAGATGCAGTGGTCCAAGGTCACAGATAAGAATGACATGATTGCTCTTTATCATCCCCAATATGGCCTC
TACTGTGGGCAGGAGCATGCCTGTGAGTCACAAGTGGCTGCCACAGAACTGAGAAGGGTGTAAACAATTGGACTCT
GTACTTAAGGAATATCTCTTCTGCCCTGGGTGGAAAGTATGAGTGCATCTTTACTCTGTATCCAGAAGGCATCAAGA
CTACAGTCTACAACCTCATTGTGGAACCTATACACAAGATGAACACAACCTATACAATAGAAAATAGAGACAAATCG
GACTCTGGAAATACCATGCTTTCAAAATACCTCCTCAGAAATCCACCTAGGTTACCTTTTCATGGTTGGTGGAGA
AAGATGGAGTGAAGAAGTTCTCTTCACCCACCATCACCACGTCAACAATTCCACATCATTTAAAGGCAGAATCAGG
CTGGGTGGAGACTATAGACTCCACCTCTCCCCAGTCCAAATCCAAGACGATGGCAGGACATTCTCTTGCCATCTGAC
TGTCAATCCTCTCAAAGCCTGGAAGATGTCCACCACAGTCAAGGTTTTTGCTAAACCAGAAATCCTCATGACTGTGG
AAAACAGCACCATGGATGTCTTAGGAGAGAGAGTATTTACCTGCCTACTGAAGAATGTGTTCCCCAAGGCAAATATC
ACCTGGTTTATAGACGGAAGATTTCTTCAAGGCAACGAAGAAGGAATATACATTACAAATGAAGAGAAGAATTGCAG
TAGCGGATTTTGGGAAGTGAAGTCAGTTTAAACAAGGATGCACAGTGGACCATCCCAATCAAACAACATGACAGCTT
GGTGTATGGCTCTGTCTCCAGGCCCCAGAAATAAAATGTGGAATACTTCATCACAACCCATCACGGTTTCCTTTGAT
TCGGTGATAGCCCCAACGAAACATCTACCCACTGTGACAGGTTCTACCTGGGTACACAACCTTTTTCAGATGCTGG
AGTATCTCCTACAGGGTATCTAGCTACACCTTCAGTGACAATTGTAGATGAAAATGGGTTGACACCAGATGCAACTC
CTCAAACCAGCAATTCCAGCATGACTACTAAAGATGGCAACTATTTGGAAGCCTCCAGTGGGACAGATGCCAAGAAC
TCCTCAAGAGCTGCTGCTTCTTCTAAAAGTGGATCTTGGCCTTTTCCTTTCACCTCTCCTCCAGAATGGCACTCACT
GCCTGGTACCTCCACTGGACCCCAAGAACCAGACTCCCCAGTTTCATGGATACCCAGTGAAGTACACACTTCAGCCC
CTTTGGACGCCAGCTTAGCTCCTCATGATACCATCATCAGTACAACCACAGAATTTCCAAATGTCCTCACAACCTGCA
AATGGAACCTACTAAAATTGACCATGGACCTATCACCAGTATCATAGTTAATCAACCCAGTGATGGAATGTCCTGGCC
TGTGCTTGTCGCGGCTTTGCTCTTTTTCTGCACACTATTGTTTGGGCTTGGAGTAAGAAAATGGTATCGGTATCAAA
ATGAAATCATGGAGAGACCCCCACCTTTCAAGCCACCACCCTCCCATCAAGTACACGTATATTCAAGAACCATT
GGATGCGACCTGTGTTGTCATGAGATGGAGGTCCTCTAA

[0152] SEQ ID NO:4小鼠CD96氨基酸序列

[0153]

MGRKWYCVVYTI IQIQFFRGVWEELFNVGDDVYALPGSDINLTCQTKENELVQMWSKVTDKNDMIALYHPQYGL
YCGQEHACESQVAATETEKGVNTWTLYLRLNISSALGGKYECIFTLYPEGIKTTVYNLIVEPYTQDEHNYTIEIETNR
TLEIPCFGNTSSEIPPRFTFSWLVEKDGVEEVLFTHHhVNNSTSSKGRIRLGGDYRLHLSPVQIQDDGRTFSCHLT
VNPLKAWKMSTTVKVFAPKEILMTVENSTMDVLGERVFTCLLKNVFPKANITWFTDGRFLQGNEEGIYITNEEKNC
SGFWELKSVLTRMHSGPSQSNMTAWCMALSPGPRNKMWNTSSQPITVSFDSVIAPTKHLPTVTGSTLGTQPFSDAG
VSPTGYLATPSVTIVDENGLTPDATPQTSNSSMTTKDGNYLEASSGTDAKNSSRAAASSKSGSWPFPFTSPPEWHSL
PGTSTGPQEPDSPVSWIPSEVHTSAPLDASLAPHDTIISTTTEFPNVLTTANGTTKIDHGPIITSIIVNQPSDGMSP
VLVAALLFFCTLLFGLGVRKWYRYQNEIMERPPPFKPPPPPIKYTYIQEPIGCDLCCHEMEVL

[0154] 表1:来自Interpro预测的CD96外部免疫球蛋白样结构域

[0155]

	人类 CD96 同种型 2 残基数	小鼠 CD96 残基数
结构域 1	30-137	30-137
结构域 2	148-250	145-247
结构域 3	253-359	250-355

[0156] 小鼠和人类CD96蛋白的外部结构域将克隆至合适的表达构建体中,用于在例如人胚肾细胞的哺乳动物细胞中表达。合适的表达构建体典型地包括CMV启动子,以驱动CD96基因片段的表达。转染至哺乳动物细胞中之后,在合适的培养条件表达蛋白,而后纯化、生产抗体。

[0157] 使用小鼠CD96外部结构域蛋白免疫四个CD96敲除小鼠,同样地,将使用纯化的人类CD96外部结构域蛋白免疫四个CD96敲除小鼠。以四周间隔、免疫接种大约三次。在第三次免疫接种后10-12天将小鼠采血,并且通过ELISA在筛选抗原上滴定血清。具有最高抗体滴度的小鼠将用于融合,否则如果小鼠没有充分地应答,将实施进一步的免疫接种。所选择的杂交瘤将被克隆,并且分别使用实施例2或3的筛选试验筛选个体人类或鼠mAb之前,纯化来自每一克隆的mAb。为了鉴定抗体不太可能或不能诱导ADCC,例如IgG2和IgG4抗体,可选地实施克隆的分型。如在实施例4的表1中列举的获得了针对人类CD96的大约20个抗体以及针对小鼠CD96的20个抗体。

[0158] 实施例5

[0159] 小鼠和人抗CD96抗体的筛选

[0160] 如实施例4中所述,获得了抗小鼠CD96和抗人类CD96大约每种20个单克隆抗体。使用在实施例2中所述的人类NK细胞试验筛选有调节CD96信号传导活性能力的抗人类CD96抗体。还筛选额外的4个商业可提供的抗人类CD96抗体(1C8、NK92.39、3H8,MAA6359)的调节CD96信号传导能力。如实施例3中所述,还将以它们调节NK细胞功能的能力筛选抗小鼠CD96mAb。

[0161] 如抗体能发生的,不是所有的抗体预期对给定靶标具有有用的作用。相应地,将使用人类或者小鼠NK细胞试验对每一抗体的CD96信号传导评估,以测定对CD96信号传导具有

作用的抗体。

[0162] 使用人类NK细胞试验的初步结果

[0163] 使用实施例2中所述的人类NK细胞试验,如图17A和17B所显示,发现NK92.39人类CD96mAb提高在人类NK细胞中IFN- γ 的水平。该结果表明在人类NK细胞中,针对人类CD96受体的抗体在提高IFN- γ 产生中有作用。

[0164] 实施例6

[0165] 在癌症模型中检验抗小鼠CD96抗体

[0166] 将在小鼠癌症模型中,检验发现在调节CD96信号传导中是有效的抗小鼠CD96抗体缓解免疫抑制、减少CD96活性和/或提高或恢复免疫监视的能力。

[0167] 如与实施例1中所使用的相同或相似,在大约5-7个癌症模型中使用体内癌症挑战,单独地检验大约10个有效的抗小鼠CD96抗体。

[0168] 针对分别的肿瘤和/或在肿瘤模型中,每个CD96抗体的作用可能变化,并且一些相对于其他的可能对处理更为应答。将检验的肿瘤和肿瘤模型的非限制性实施例包括乳腺、前列腺、肺、黑色素瘤、结肠直肠、胰腺、子宫内膜、肾、肠、胃、食管、白血病、淋巴瘤、卵巢、膀胱和脑的癌症,包括原发肿瘤和/或前述癌症的转移。

[0169] 实施例7

[0170] 人类CD96抗体结合研究

[0171] 将检测一组抗人类CD96抗体,以进一步测定有效的CD96抗体所结合的CD96的结构域。如上实施例3中所讨论的,CD96的同种型2包括3个外部结构域(结构域1、2和3)。

[0172] 抗体将结合于CD96蛋白,并且将使用氢/氘交换和质谱^{23,24}测定特异CD96蛋白残基结合。或者可以利用其他方法探测抗体-CD96结合位点,例如X射线晶体学、位点定向诱变或者其他现有技术已知的方法。

[0173] 预期有效的抗体可结合一个或多个CD96蛋白的外部结构域。例如,调节人类NK细胞功能的抗CD96抗体可以结合以下外部CD96结构域的组合的任一个,可能的具有单独或组合结合结构域的每种在括号中显示:(1)、(2)、(3)、(1,2)、(1,3)、(2,3)、(1,2,3)。

[0174] 实施例8

[0175] CD96在NK细胞和T细胞功能中的作用

[0176] 自然杀伤(NK)细胞是先天淋巴细胞,其可能在限制早期肿瘤生长和转移中至关重要,然而T细胞在建立的和原发肿瘤的控制中更为重要。CD96是一个能够影响NK细胞和T细胞功能的检查点免疫调节因子。

[0177] 使用原发肿瘤检测CD96在T细胞中的作用。使用AT3-OVA^{dim}模型,已知该模型中CD8⁺T效应细胞自然地控制肿瘤生长。皮下注射AT3-OVA^{dim}乳腺癌细胞(1×10^6 细胞)。接着监测小鼠肿瘤生长,并且用游标规(caliper square)测量两垂直直径的乘积作为测量值(mm^2)。

[0178] 抗CD96处理极大地减少了肿瘤生长率,并且该有益作用可以通过使用抗CD4/CD8抗体删除CD4和CD8T细胞或者通过使用抗IFN- γ 处理所删除(图16A和16B)。这证明在具体地肿瘤模型中,抗CD96mAb关键地需要CD8⁺T细胞和IFN- γ 以使抗肿瘤活性完整。

[0179] 实施例9

[0180] 在 α CD96mAb结合后CD96从NK细胞表面缺失

[0181] 抗体结合CD96发生的机制的/信号传导作用还可揭示关于CD96-CD155结合作用的

功能信息。为进一步研究这方面,使用人类NK细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec.),通过阴性选择纯化来自人类外周血单个核细胞(PBMCs)的总NK细胞。接着使用羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester,CFSE;Biolegend)标记分离的NK细胞用以测量细胞增殖。CFSE标记的NK细胞以 5×10^4 细胞/孔铺板于96孔U底板,并且在以 $30 \mu\text{g/ml}$ 的对照IgG或者抗人类CD96mAb(克隆NK92-39)存在时,以所示浓度(10单位/ml和25单位/ml)使用重组IL-2刺激。使用BD FACS Canto II(BD Biosciences)评估第3天和第6天NK细胞增殖的变化或者表面CD96的存在/不存在,并且使用Flowjo(Tree star)实施分析(图18(A)和(B))。抗CD96结合CD96对NK细胞增殖没有作用,但是第6天出现在细胞表面的CD96水平的极大减少,通过mAb结合后的CD96内化或者可能通过CD96表达的减少。

[0182] 说明书全部的目的在于描述本发明优选地实施方案,不在于限制本发明为任一实施方案或者特征的具体集合。因此本领域技术人员应当理解,在本公开的前提下,可以修改或改变根据本公开所举例的具体实施方案,而不背离本发明的范围。

[0183] 本文所提及的所有计算机程序、算法、专利和科学文献通过参考文献包含在本文中。

[0184] 参考文献

[0185] 1.Vivier,E.,Tomasello,E.,Baratin,M.,Water,T.&Ugolini,S.Functions of natural killer cells.Nature immunology 9,503-510(2008).

[0186] 2.Lanier,L.L.Up on the tightrope:natural killer cell activation and inhibition.Nature immunology 9,495-502(2008).

[0187] 3.Chan,C.J.,Smyth,M.J.&Martinet,L.Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress.Cell death and differentiation(2013).

[0188] 4.Raulet,D.H.&Vance,R.E.Self-tolerance of natural killer cells.Nature reviews 6,520-531(2006).

[0189] 5.Fuchs,A.&Colonna,M.The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance.Seminars in cancer biology 16,359-366(2006).

[0190] 6.Shibuya,A.,等人.DNAM-1,a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes.Immunity 4,573-581(1996).

[0191] 7.Wang,P.L.,O'Farrell,S.,Clayberger,C.&Krensky,A.M.Identification and molecular cloning of tactile.A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily.J Immunol 148,2600-2608(1992).

[0192] 8.Yu,X.,等人.The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells.Nature immunology 10,48-57(2009).

[0193] 9.Boles,K.S.,等人.A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4T cells to follicular DC.European journal of immunology 39,695-703(2009).

- [0194] 10.Kennedy,J.,等人.A molecular analysis of NKT cells:identification of a class-I restricted T cell-associated molecule(CRTAM).Journal of leukocyte biology 67,725-734(2000).
- [0195] 11.Bottino,C,等人.Identification of PVR(CD155)and Nectin-2(CD112)as cell surface ligands for the human DNAM-1(CD226)activating molecule.The Journal of experimental medicine 198,557-567(2003).
- [0196] 12.Lozano,E.,Dominguez-Villar,M.,Kuchroo,V.&Hafler,D.A.The TIGIT/CD226axis regulates human T cell function.Journal of immunology 188,3869-3875 (2012).
- [0197] 13.Lakshmikanth,T,等人.NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo.The Journal of clinical investigation 119,1251-1263(2009).
- [0198] 14.Chan,C.J.,等人.DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases.J Immunol 184,902-911(2010).
- [0199] 15.Gilfillan,S.,等人.DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors.The Journal of experimental medicine 205,2965-2973(2008).
- [0200] 16.Iguchi-Manaka,A.,等人.Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1receptor.The Journal of experimental medicine 205,2959-2964(2008).
- [0201] 17.Stanietsky,N,等人.The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106,17858-17863(2009).
- [0202] 18.Stanietsky,N,等人.Mouse TIGIT inhibits NK-cell cytotoxicity upon interaction with PVR.European journal of immunology(2013).
- [0203] 19.Liu,S.,等人.Recruitment ofGrb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells.Cell death and differentiation 20,456-464(2013).
- [0204] 20.Fuchs,A.,Cella,M.,Kondo,T.&Colonna,M.Paradoxic inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44.Blood 106,2076-2082(2005).
- [0205] 21.Seth,S.,等人.The murine pan T cell marker CD96 is an adhesion receptor for CD155 and nectin-1.Biochemical and biophysical research communications 364,959-965(2007).
- [0206] 22.Fuchs,A.,Cella,M.,Giurisato,E.,Shaw,A.S.&Colonna,M.Cutting edge: CD96(tactile)promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor(CD 155).J Immunol 172,3994-3998(2004).
- [0207] 23.Aim,J.,Skilfon,J.&Yu,K.Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry:An Emerging Biophysical Tool for Probing Protein Behavior and

Higher-Order Structure.LCGC NORTH AMERICA VOLUME 31NUMBER 6(2013).

[0208] 24.Percy,A.J,Rey,M,Burns,K,M.&Schriemer,D,C Probing protein interactions with hydrogen/deuterium exchange an mass spectrometry—A review.Analytica Chimica Acta 721(2012)7-21(2012).

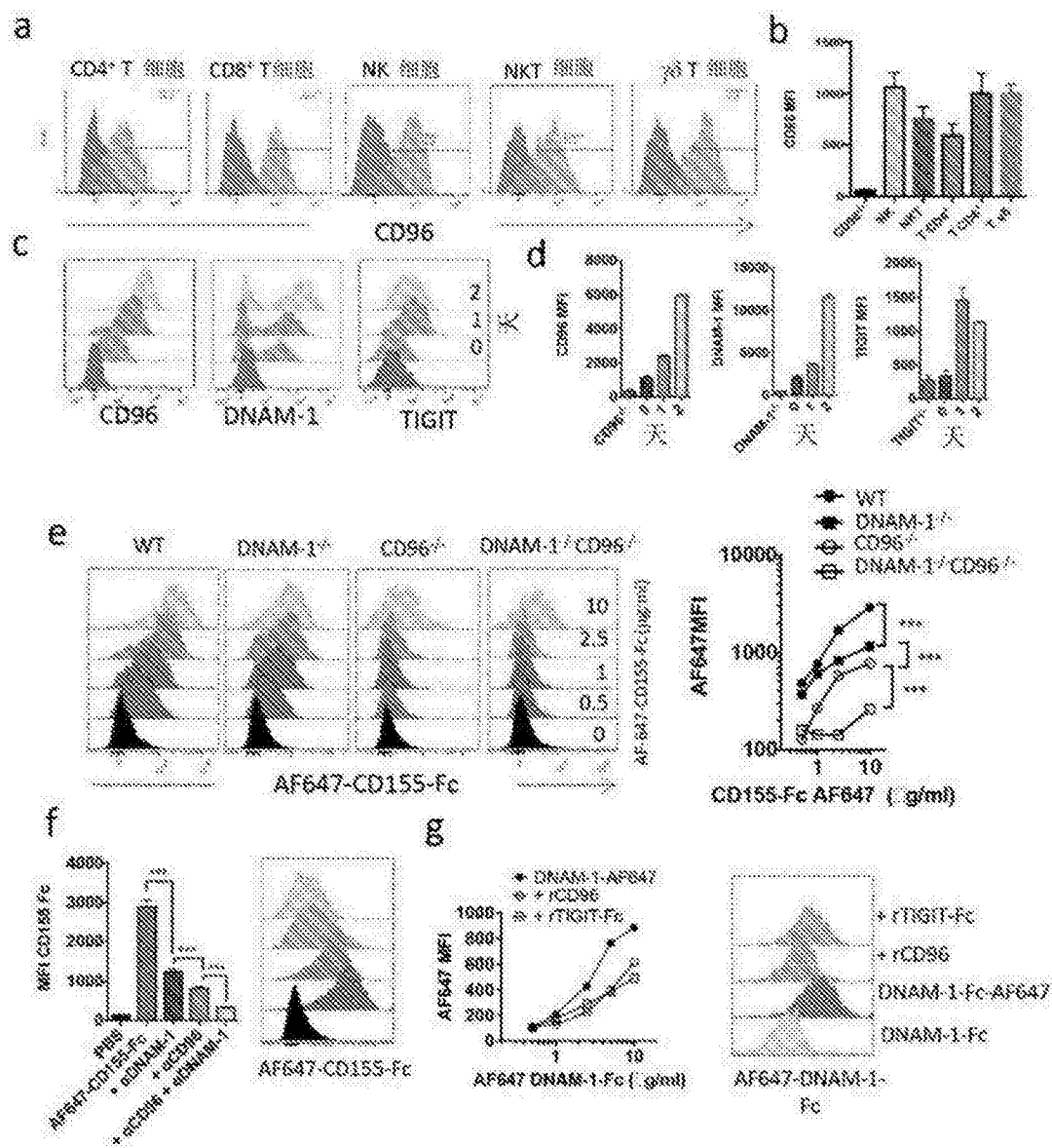


图1

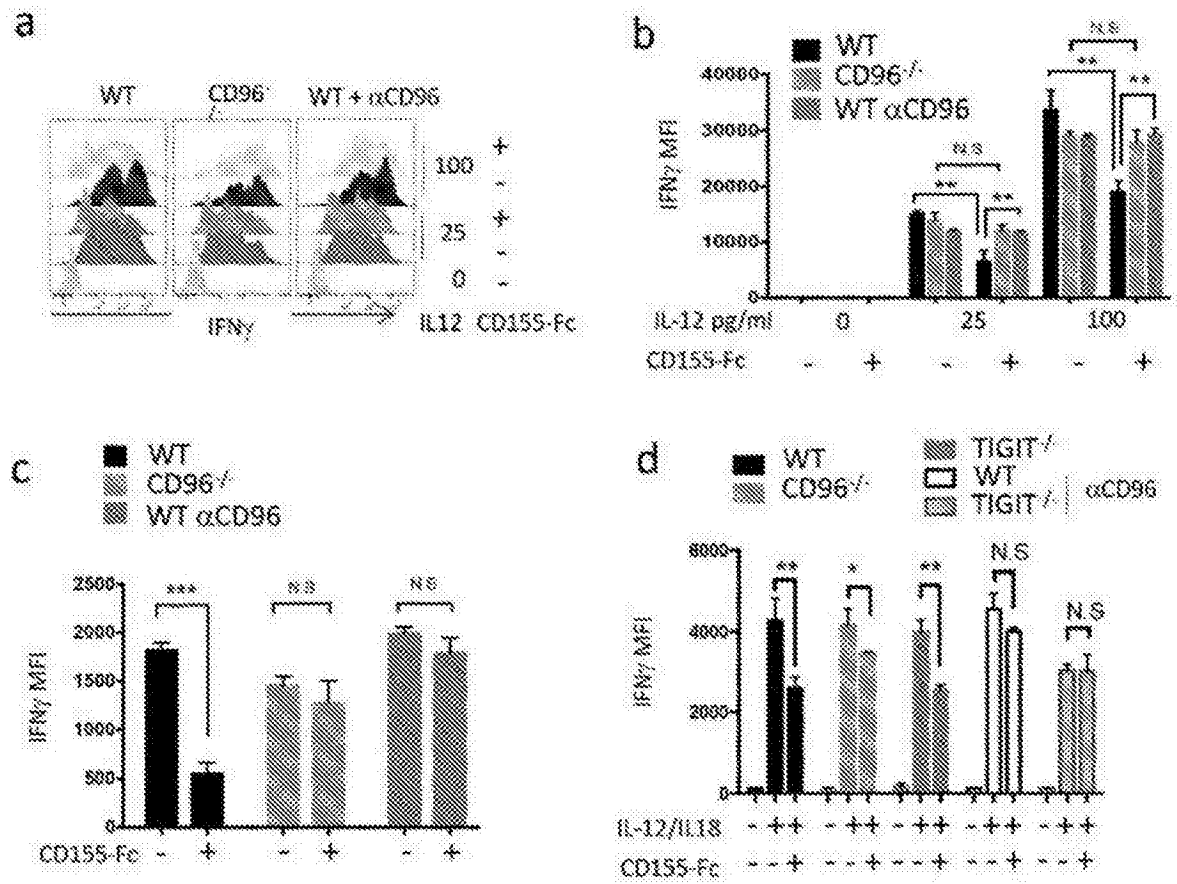


图2

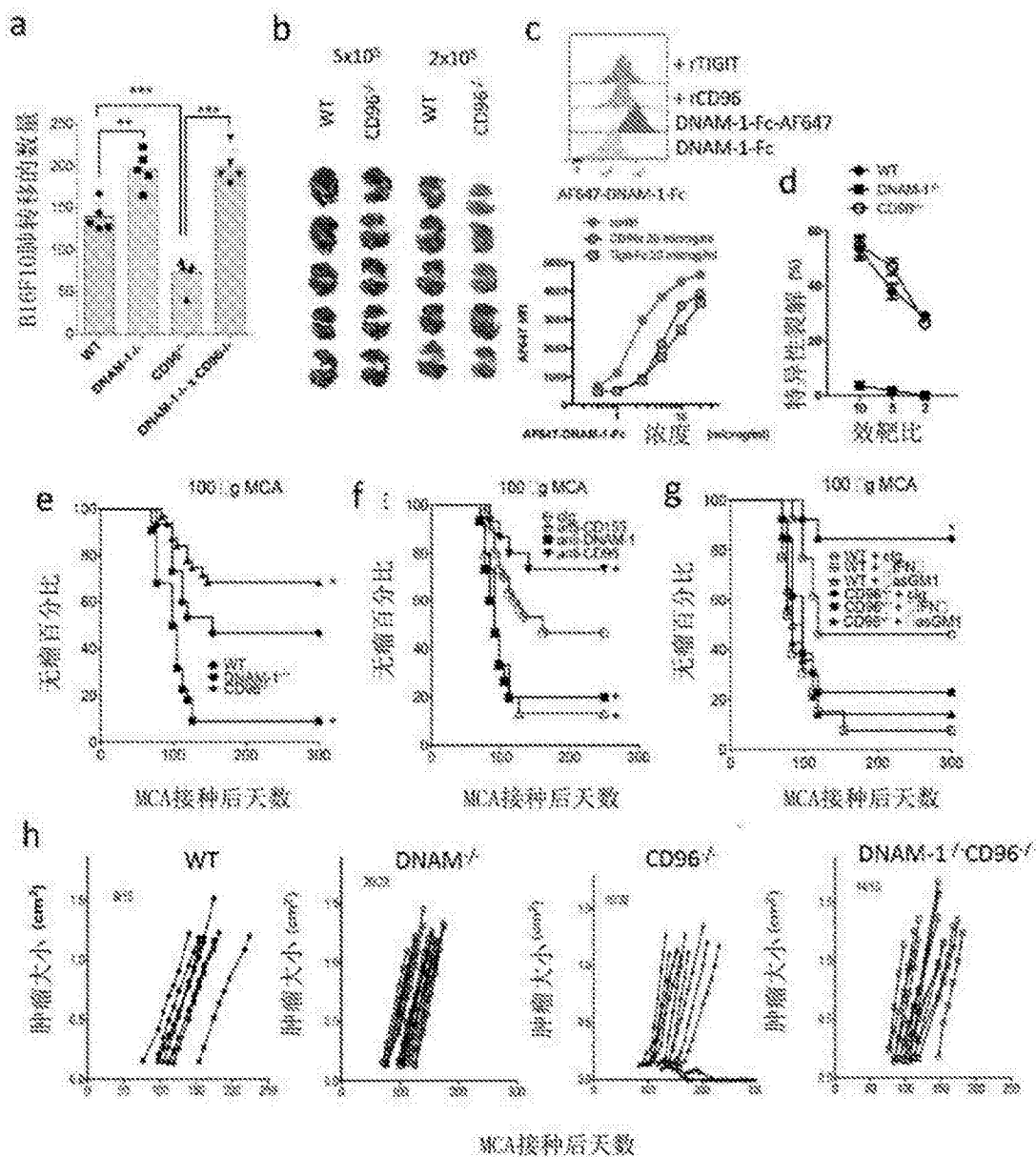


图3

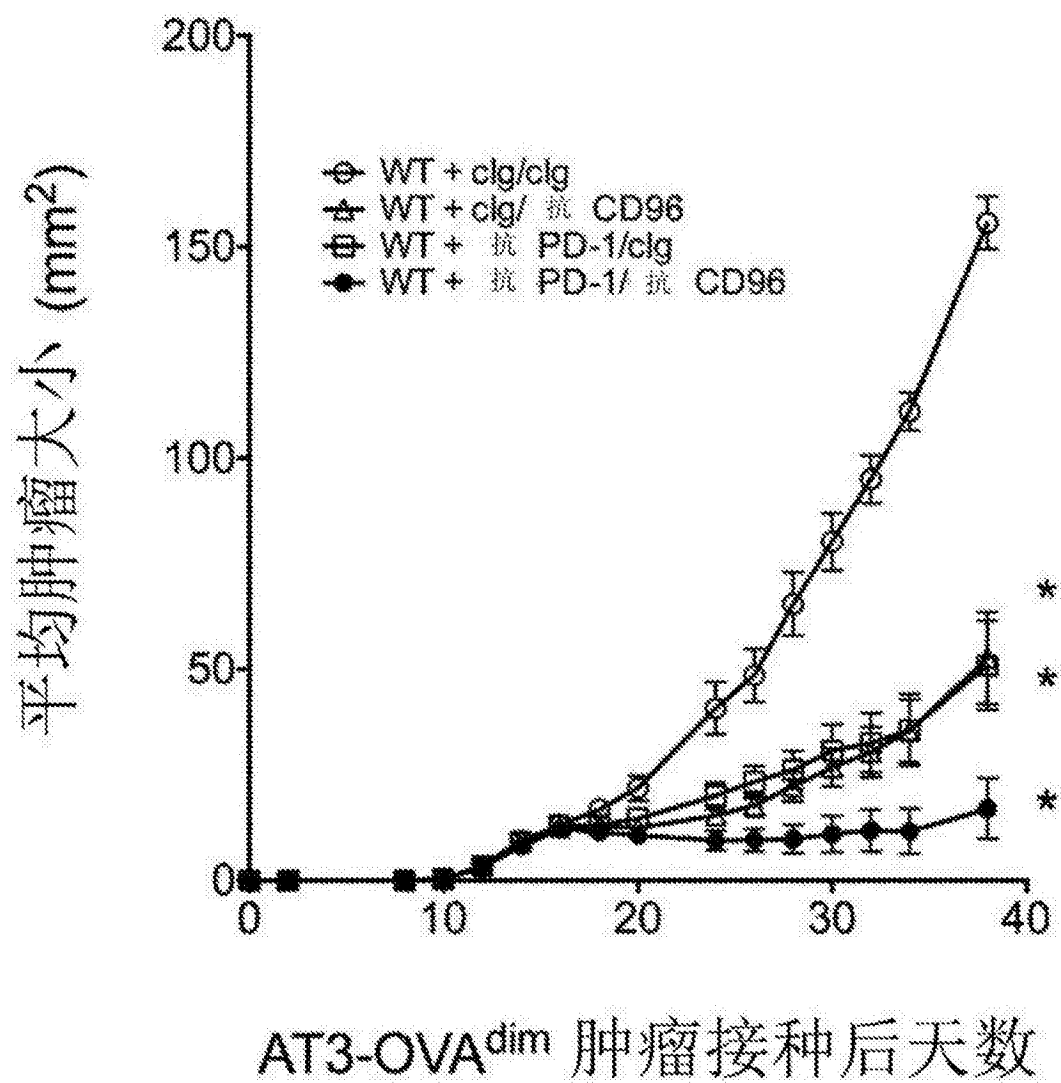


图4

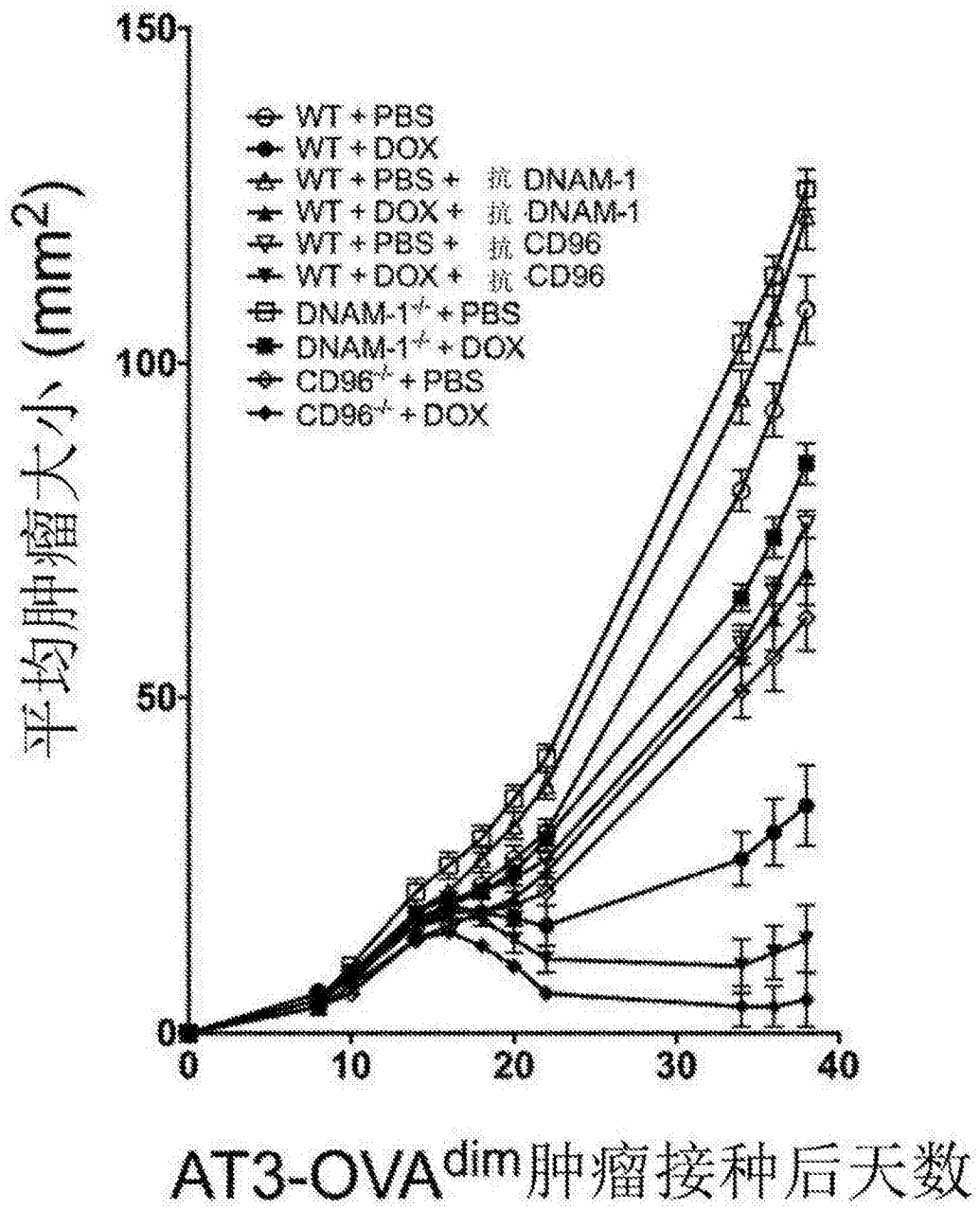


图5

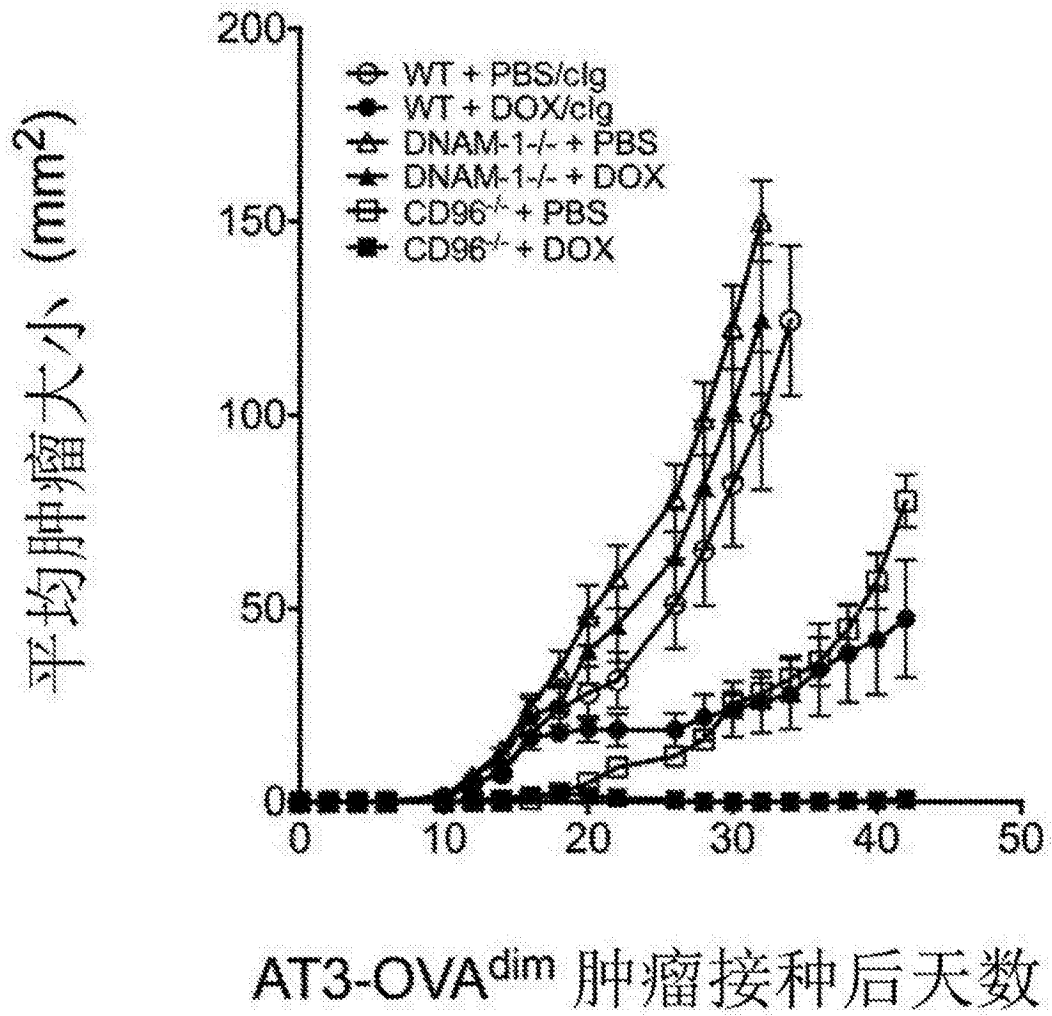


图6

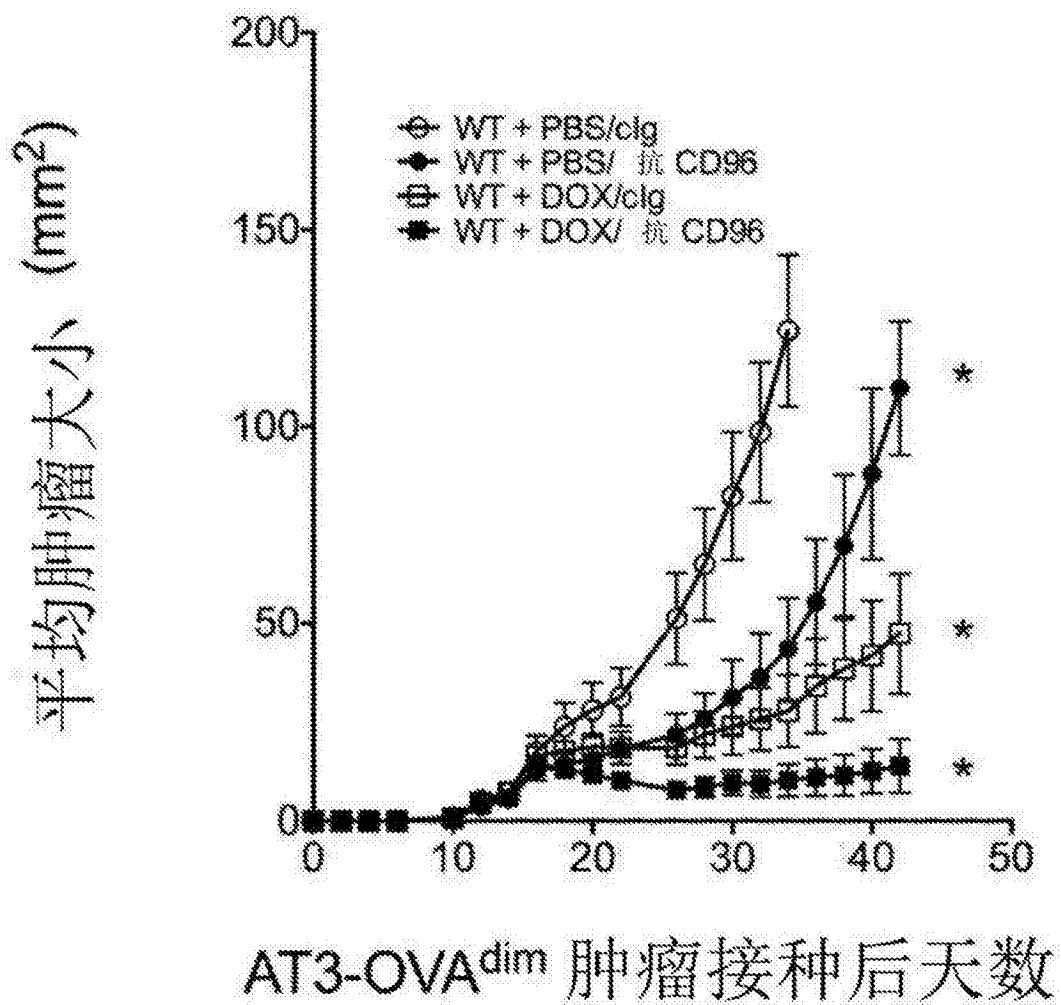


图7

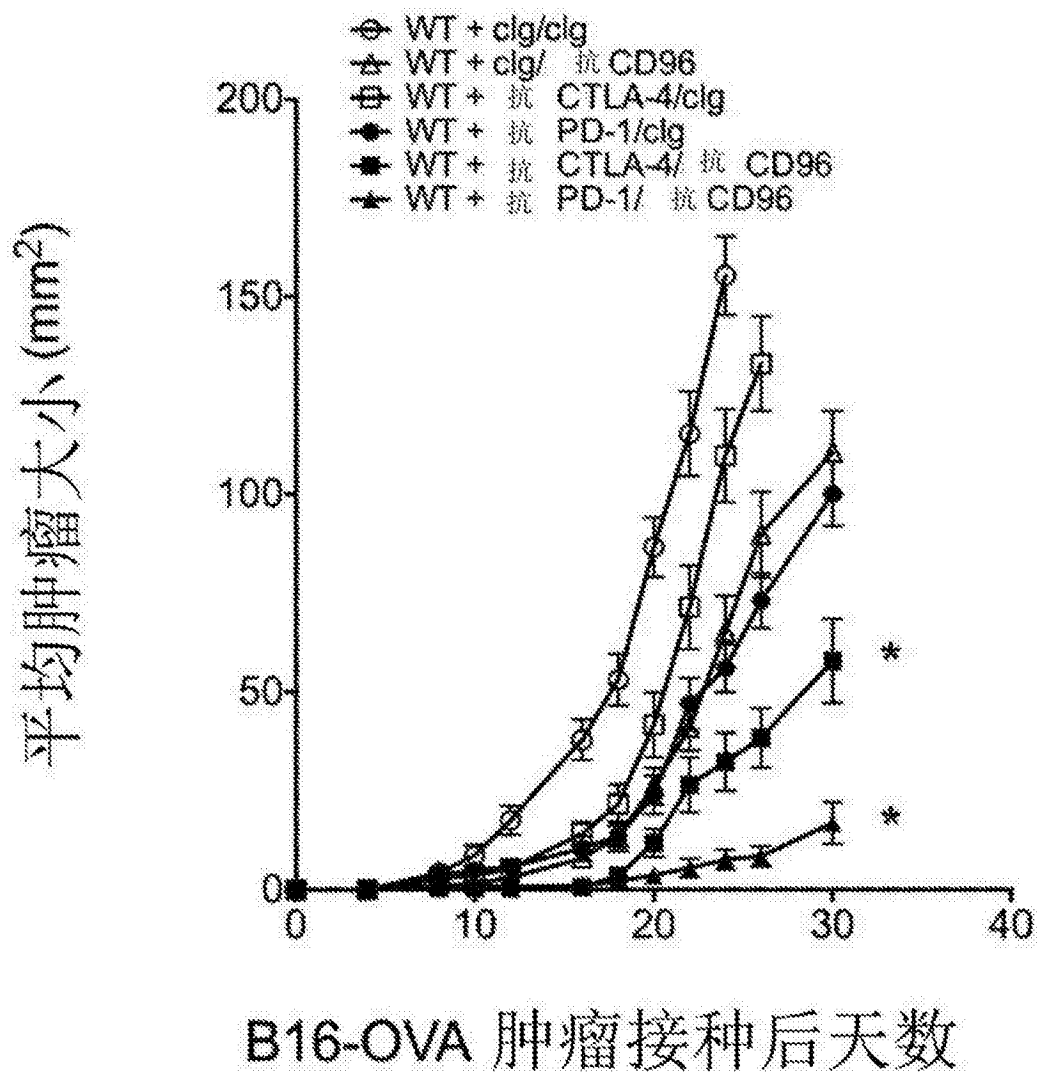


图8

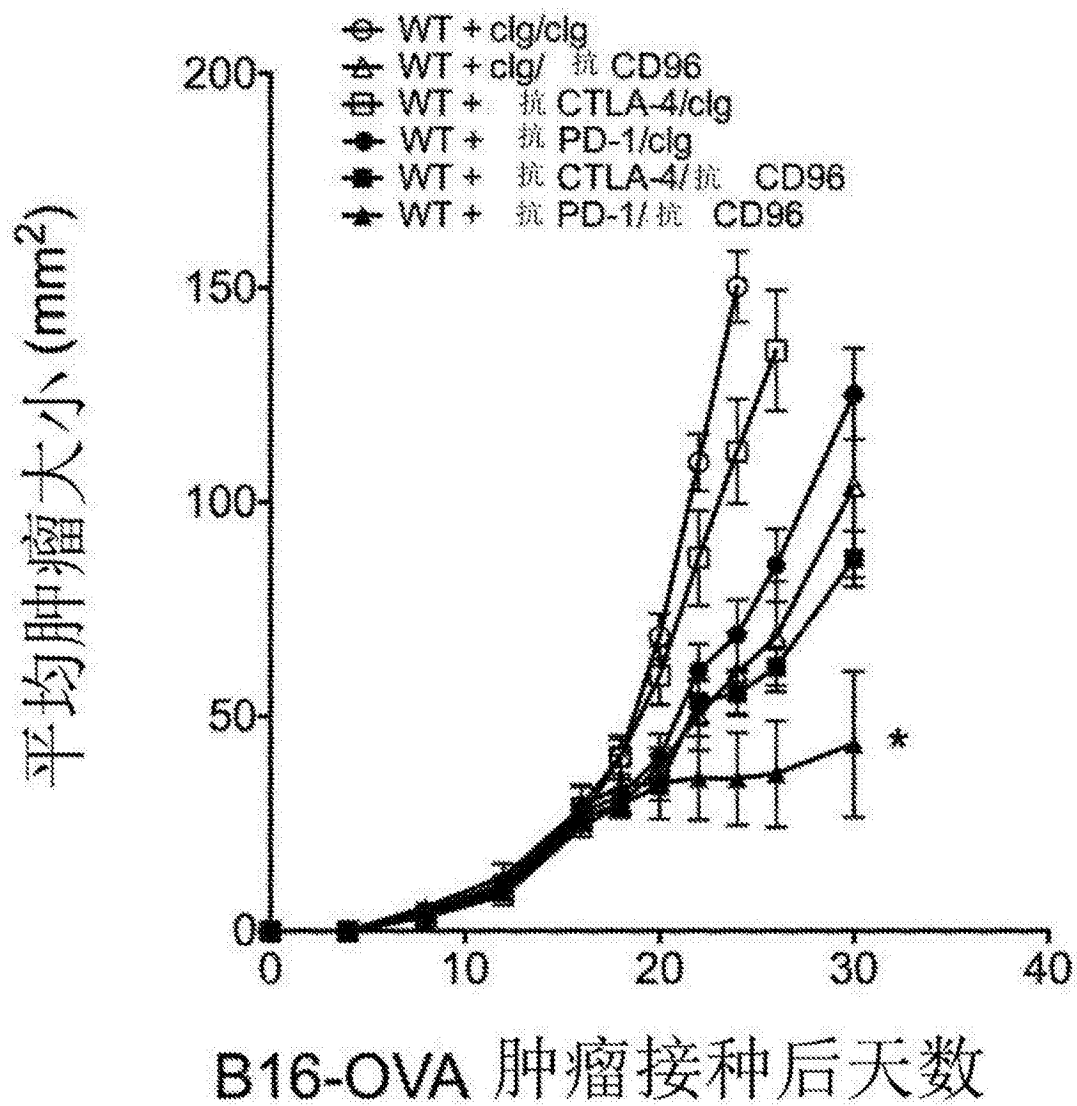


图9

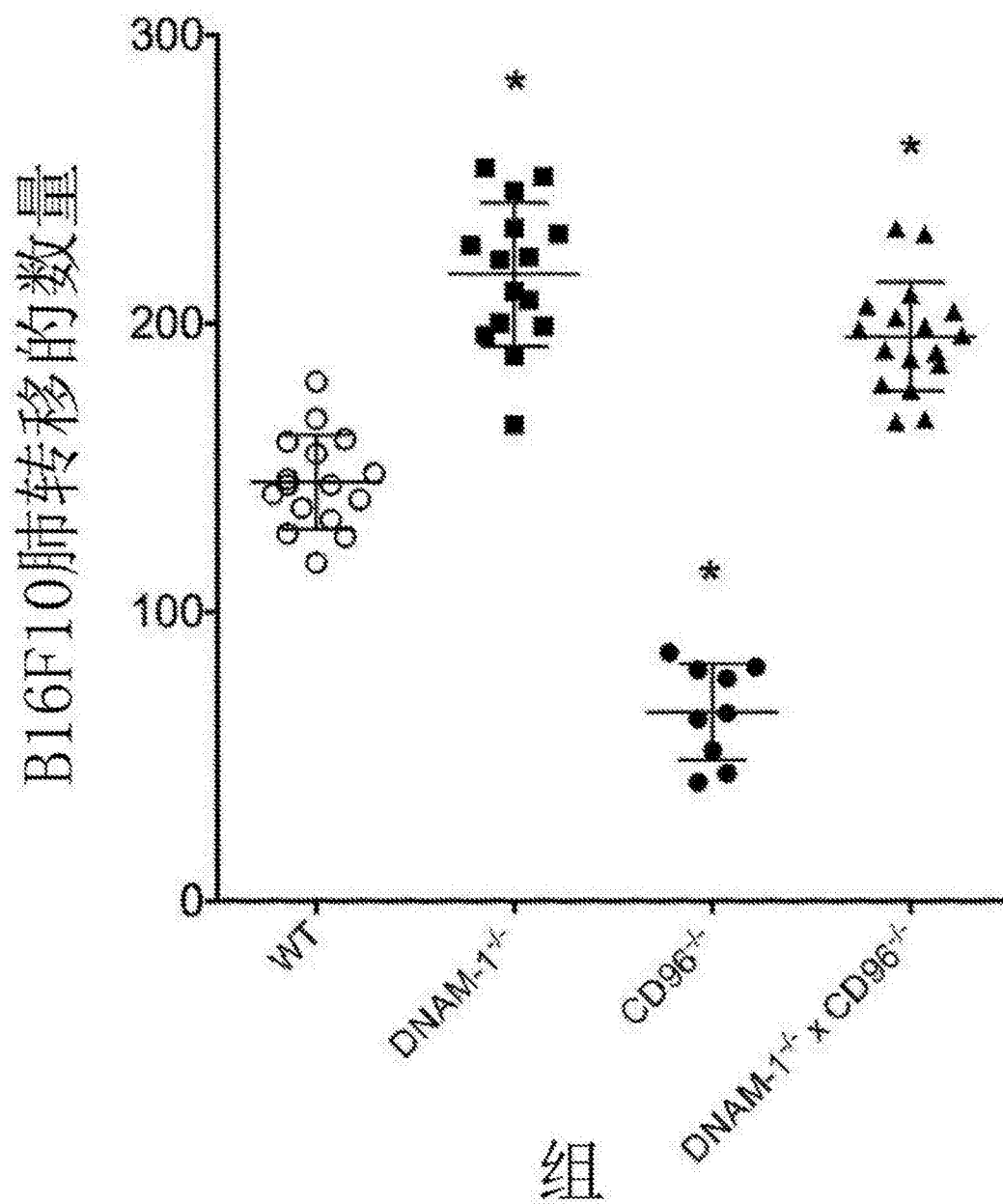


图10

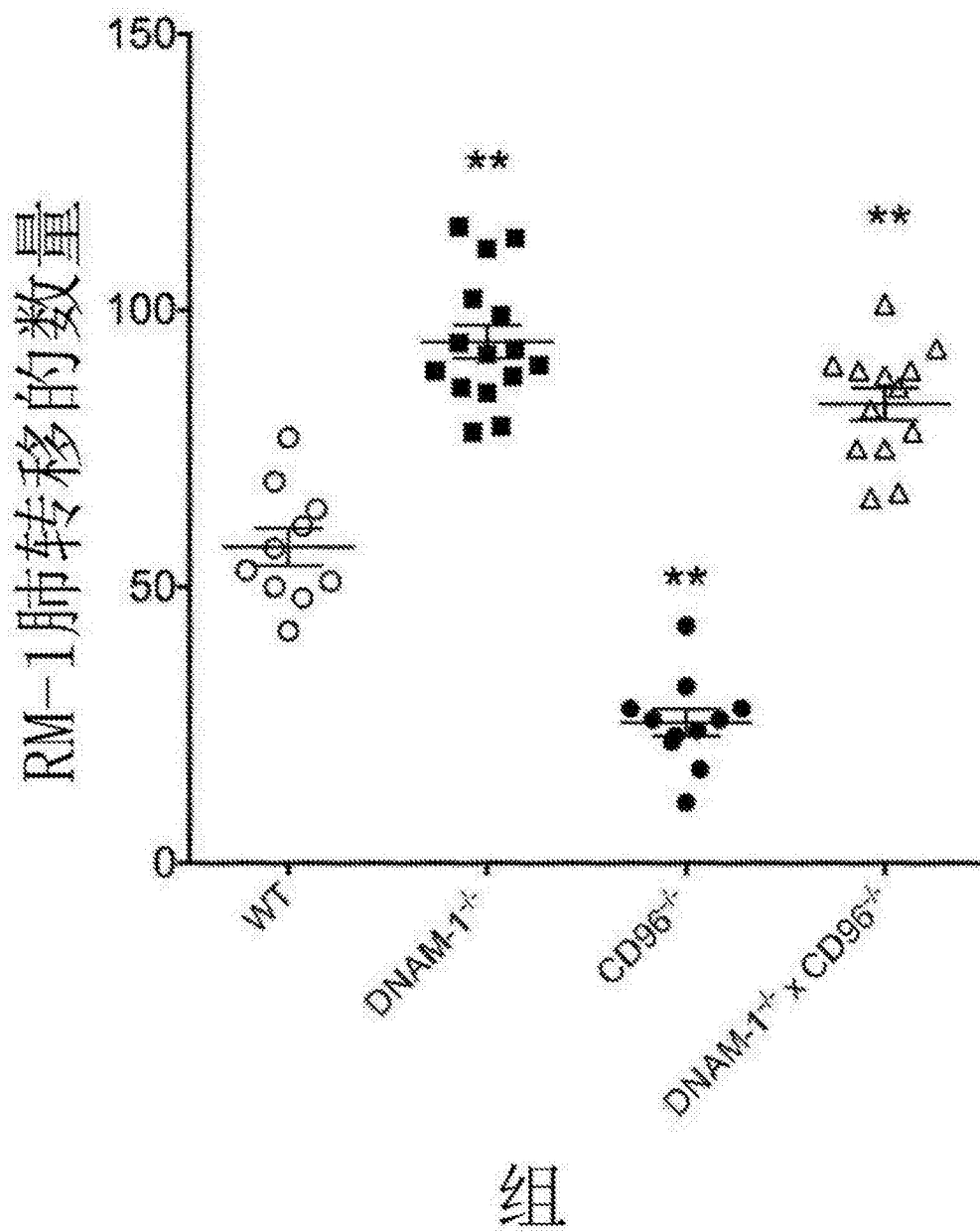


图11

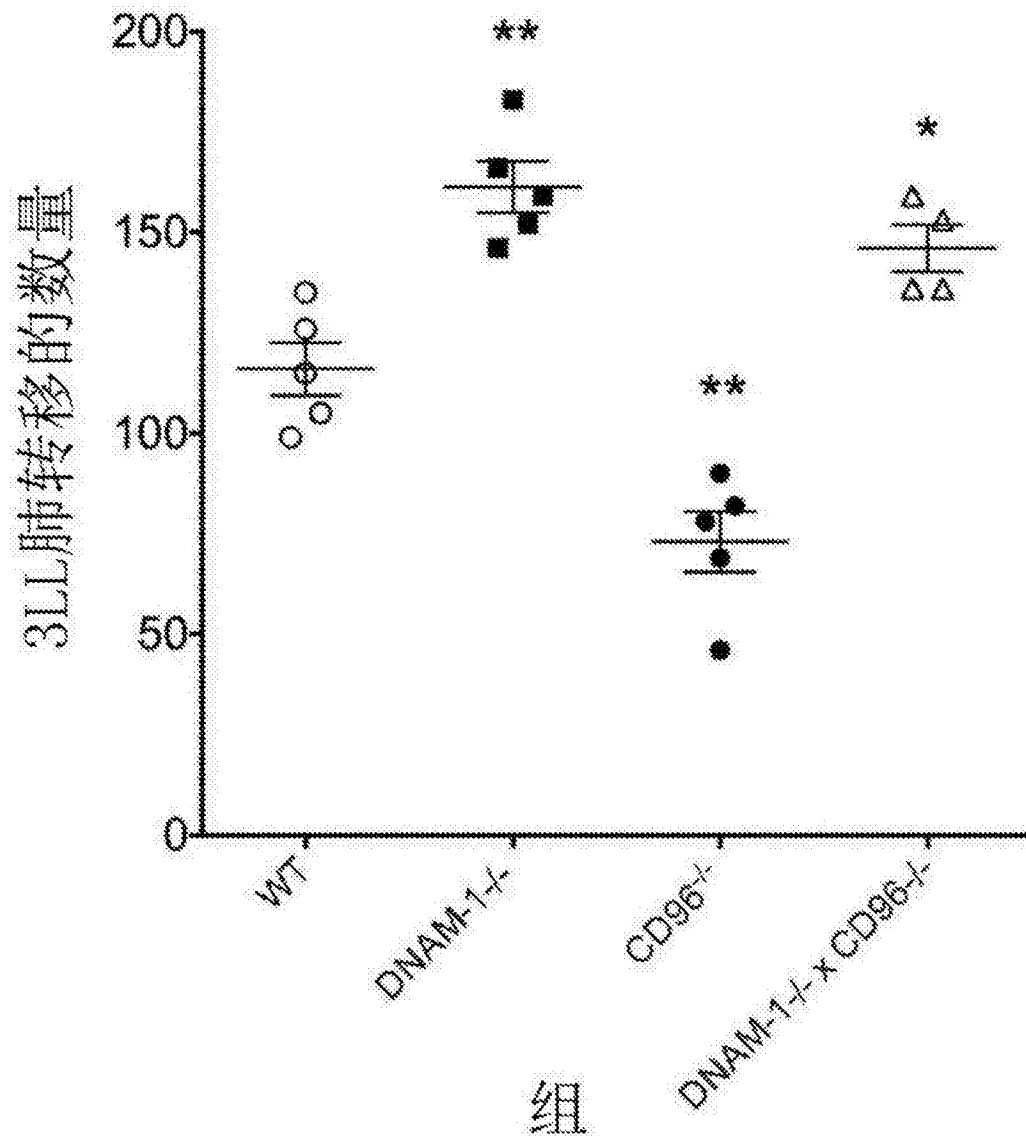


图12

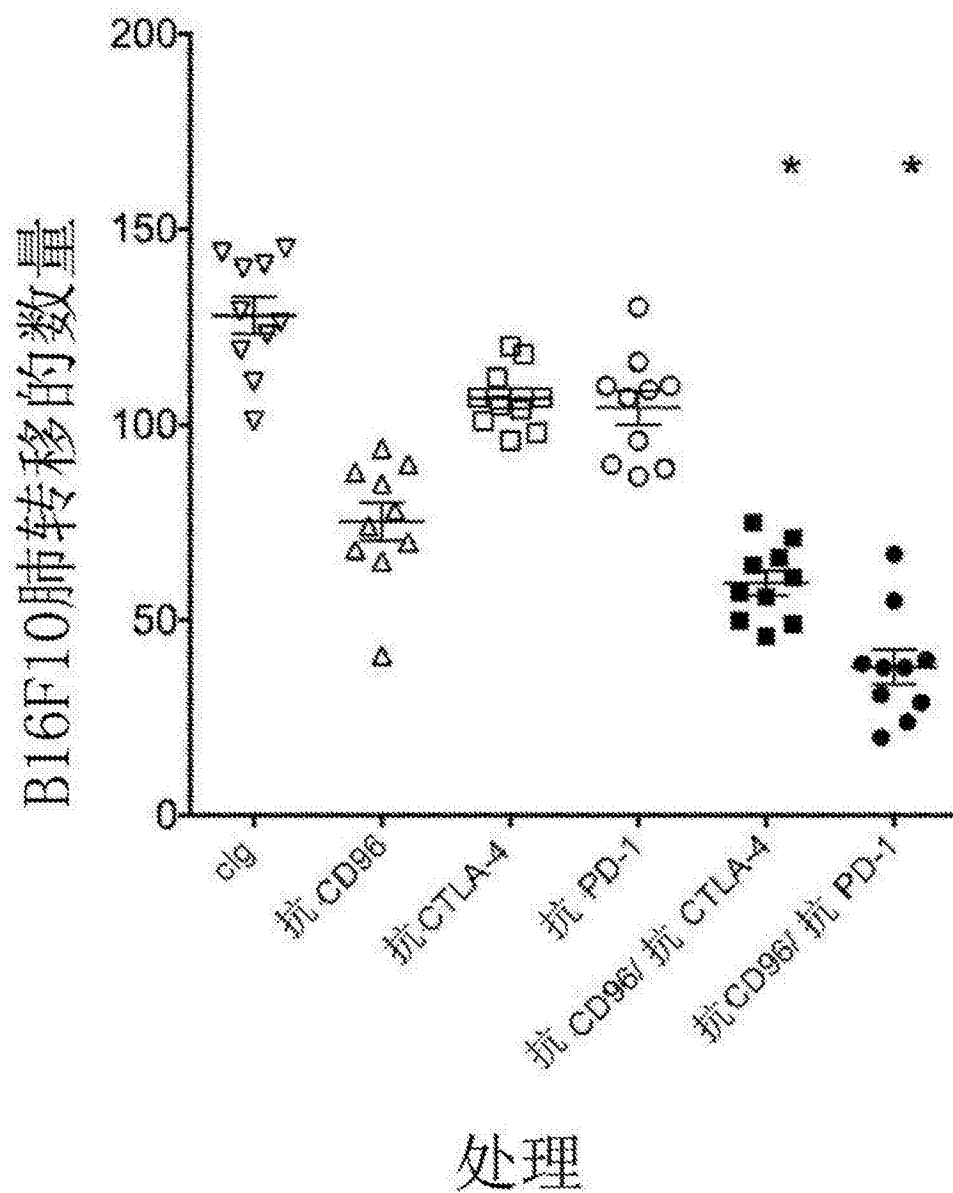


图13

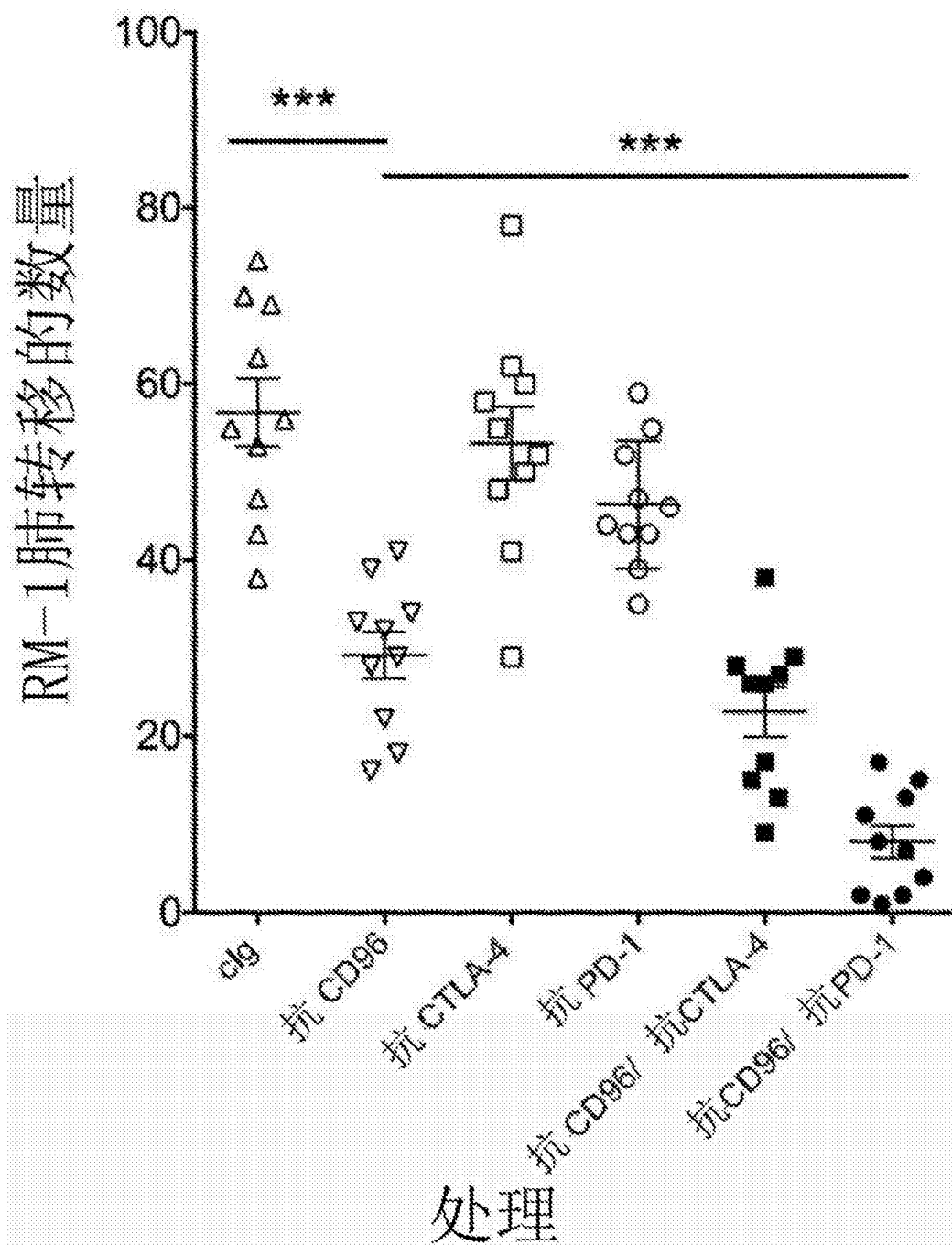


图14

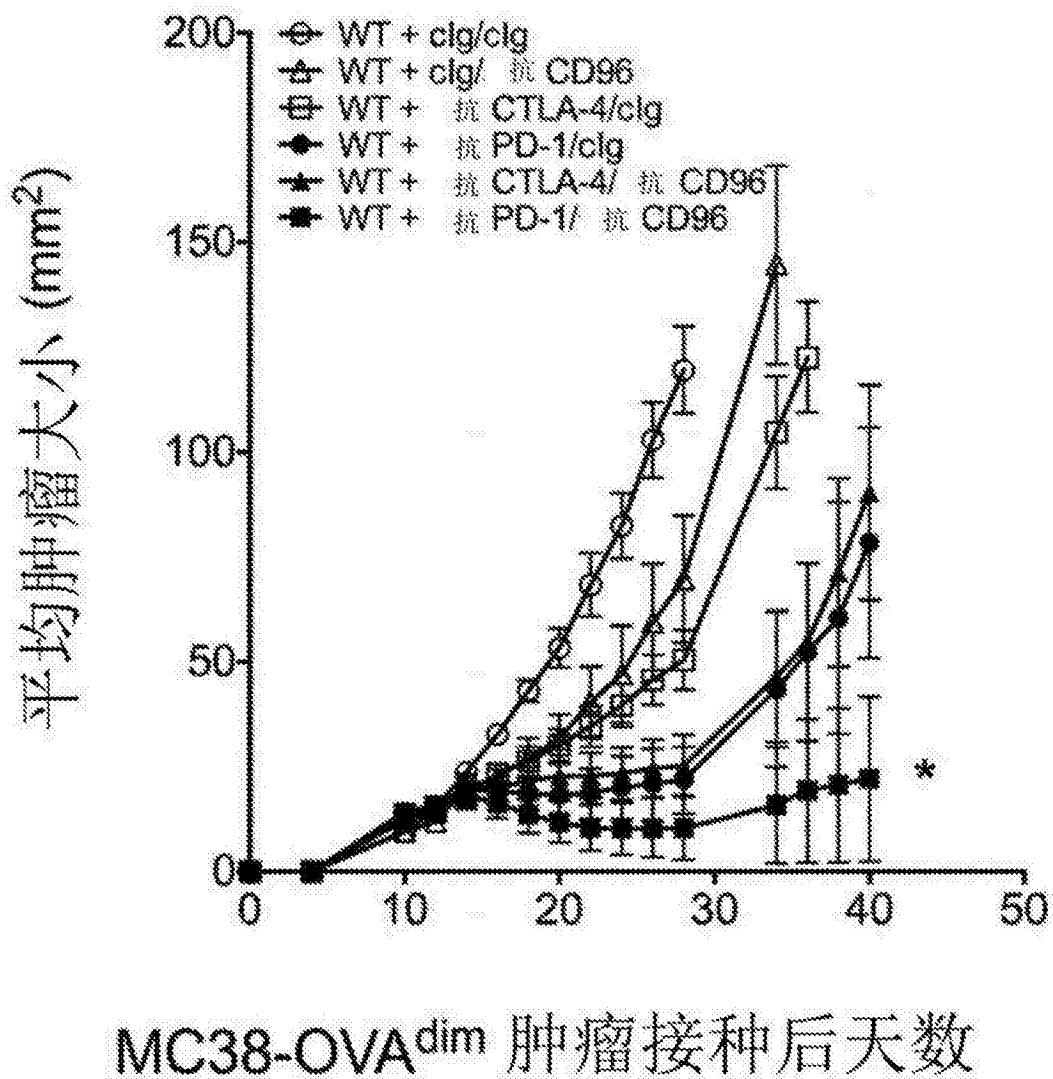


图15

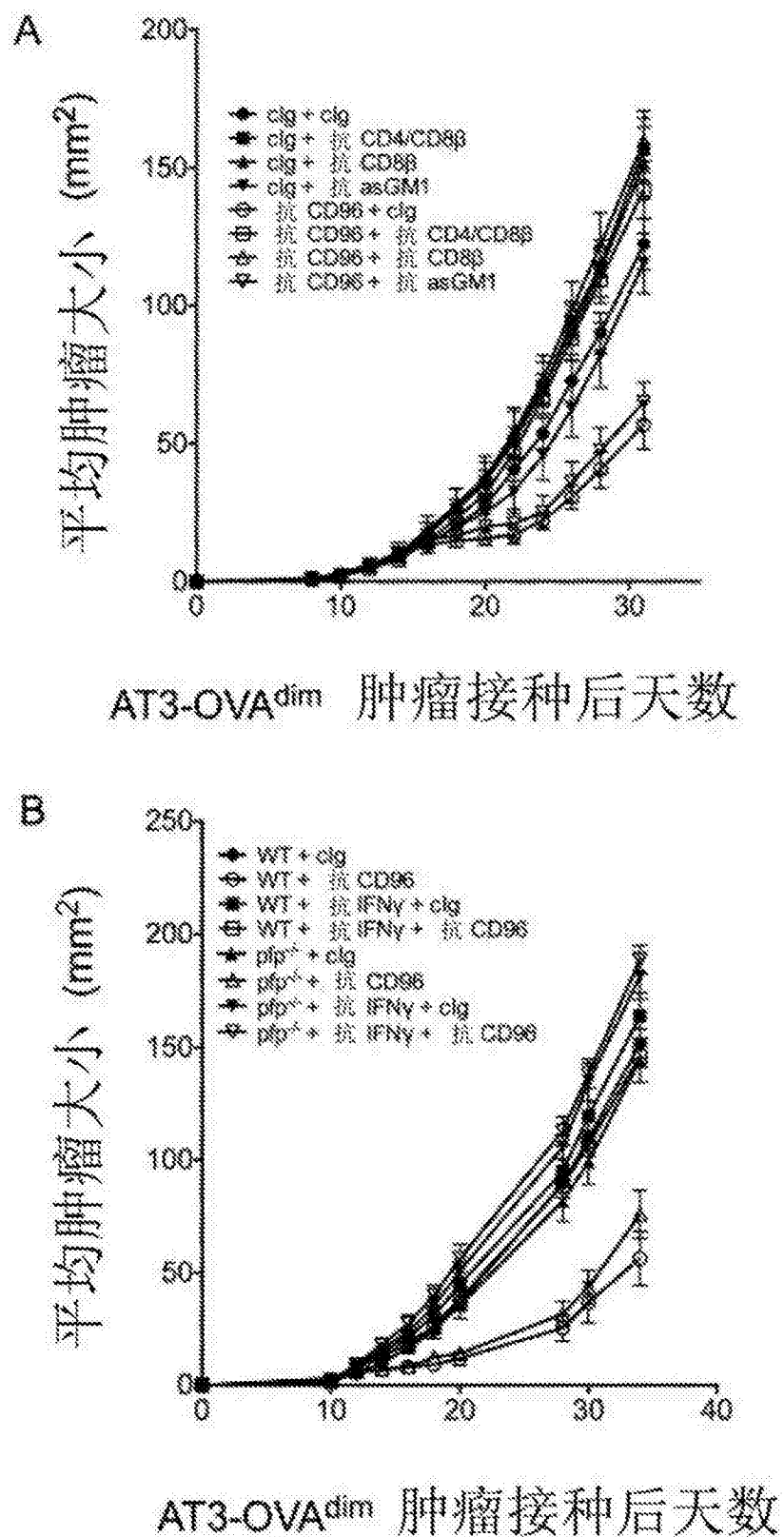


图16

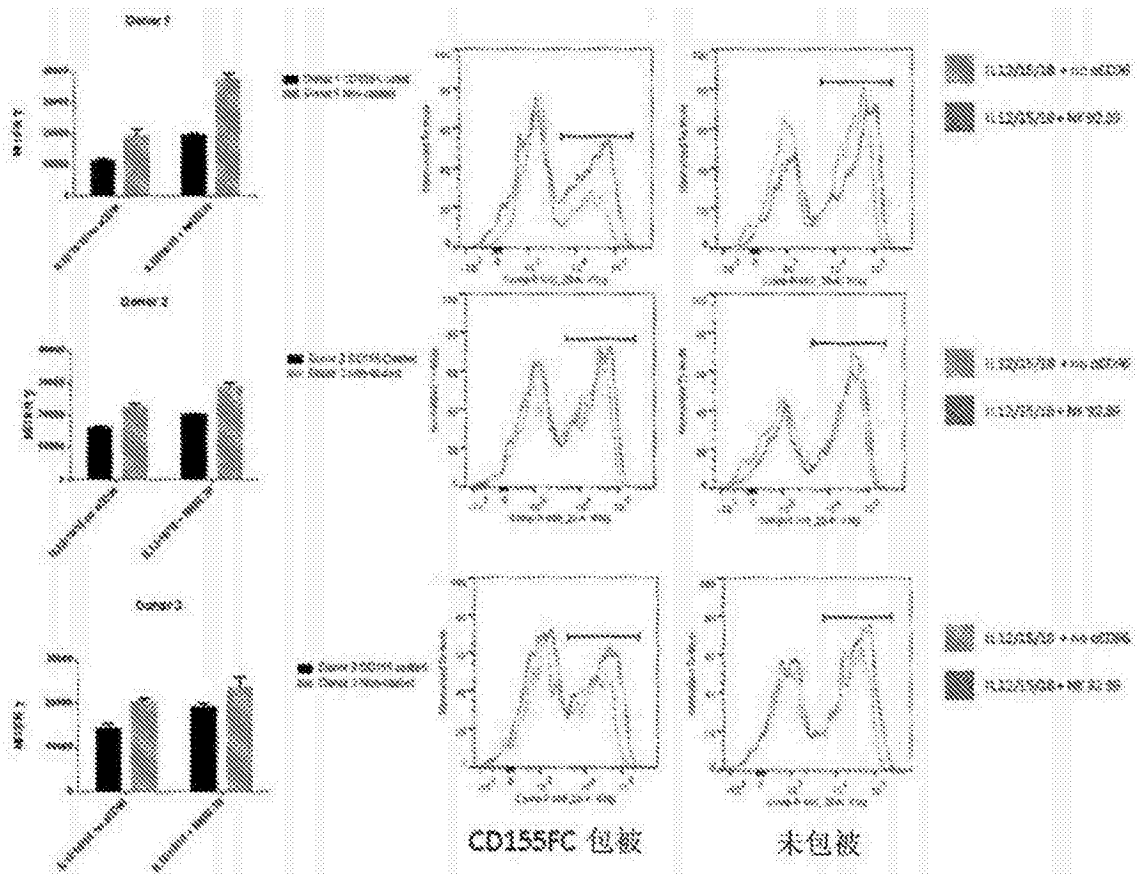


图17A

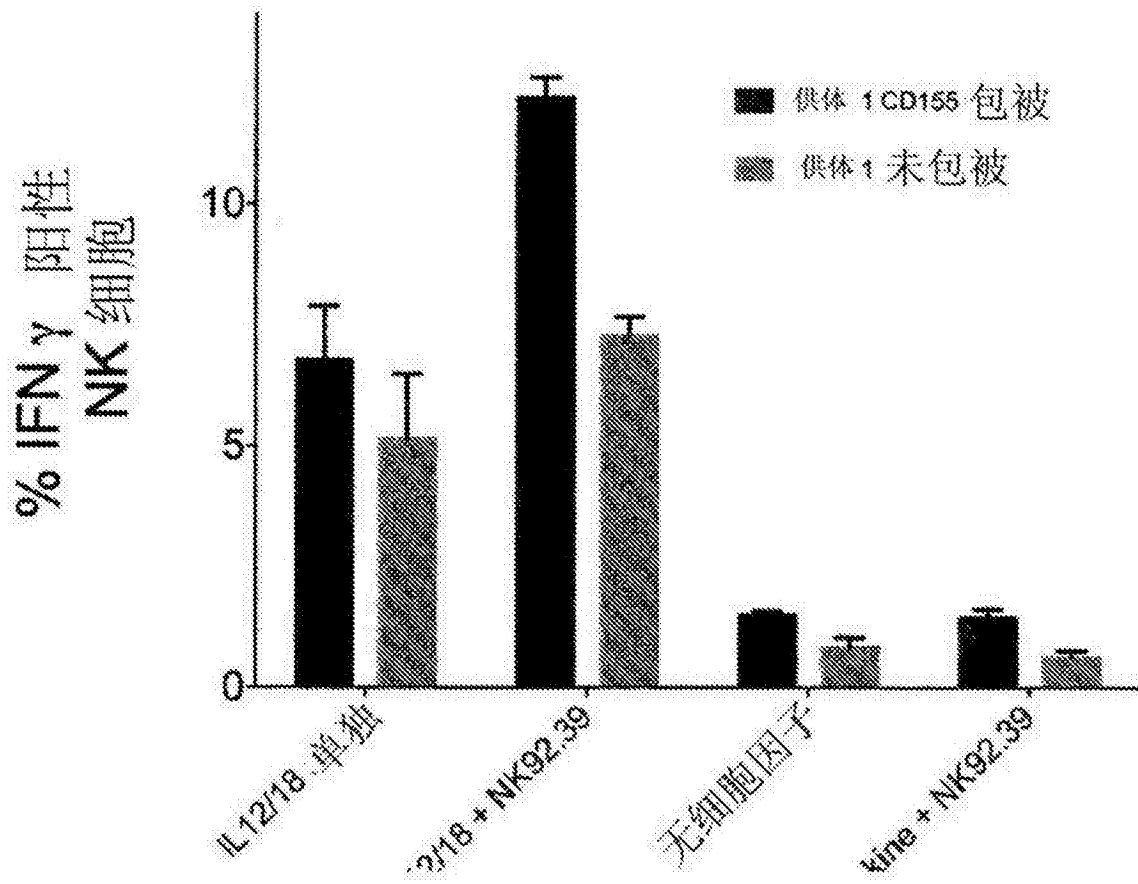
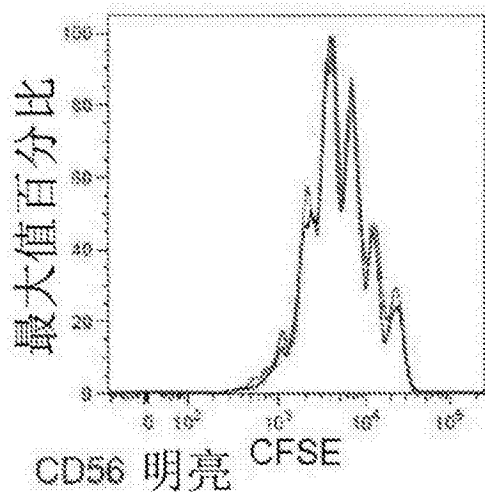
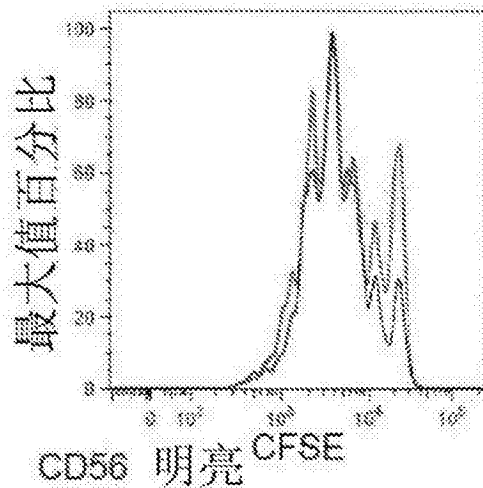


图17B



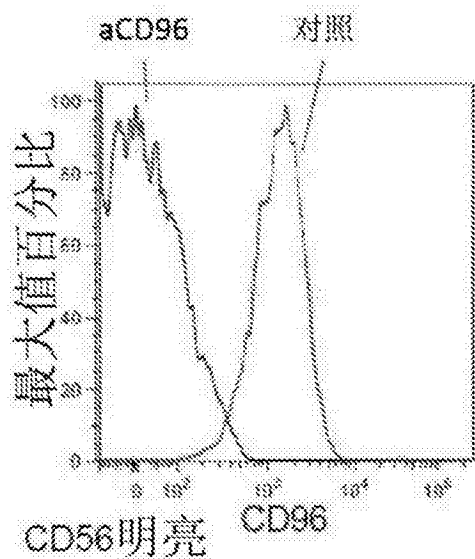
样本	%
10u IL-2 aCD96.fcs	18.5
10u IL-2 cdg.fcs	18.1

10单元/ml
IL-2



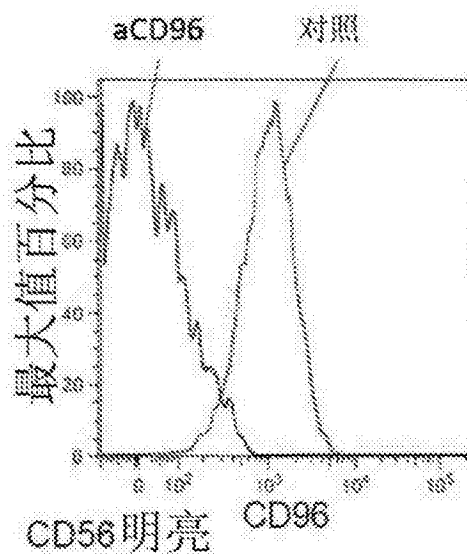
样本	%
25u IL-2 aCD96.fcs	19.1
25u IL-2 cdg.fcs	21.5

25单元/ml
IL-2



样本	%
10u IL-2 aCD96.fcs	18.5
10u IL-2 cdg.fcs	18.1

10单元/ml
IL-2



样本	%
25u IL-2 aCD96.fcs	19.1
25u IL-2 cdg.fcs	21.5

25单元/ml
IL-2

图18